

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**GUILHERME BARROSO LANGONI DE FREITAS**

**DESENVOLVIMENTO DE CAPSAICINA NANOENCAPSULADA COM  
ALBUMINA E AVALIAÇÃO SOBRE O POTENCIAL TERAPÊUTICO  
ANTITUMORAL**

**CURITIBA**

**2016**

GUILHERME BARROSO LANGONI DE FREITAS

**DESENVOLVIMENTO DE CAPSAICINA NANOENCAPSULADA COM  
ALBUMINA E AVALIAÇÃO SOBRE O POTENCIAL TERAPÊUTICO  
ANTITUMORAL**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau  
de Doutor em Medicina Interna e Ciências da Saúde, no  
Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências  
da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade  
Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Iara José de Messias Reason

Co-orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

CURITIBA

2016

F866 Freitas, Guilherme Barroso Langoni de

Desenvolvimento de capsaicina nanoencapsulada com albumina e avaliação sobre o potencial terapêutico antitumoral./ Guilherme Barroso Langoni de Freitas. – Curitiba, 2016.

140f.; 30 cm.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>Iara José de Messias Reason

Co-orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

Tese(Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Neoplasias. 2. Antineoplásicos fitogênicos. 3. Capsaicina. 4. Albumina. 5. Nanopartículas. I. Reason, Iara José de Messias. II. Khalil, Najeh Maissar. III. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná IV. Título.

NLMC: QZ 267



## PARECER

Aos vinte e seis dias do mês de agosto do ano de dois mil e dezesseis, a banca examinadora constituída pelos Professores: Dra. Flávia Lada Degaut Ponte (Depto. De Farmácia - UFPR), Dra. Ana Paula Martins Sebastião (Depto. de Patologia Médica - UFPR), Dra. Fernanda Bovo (Depto. de Farmácia - UFPR), Dr. Luiz Cláudio Fernandes (Depto. de Ciências Biológicas - UFPR) e Dra. Iara Taborda de Messias - Reason (Depto. De Patologia Médica - UFPR), exarou o presente parecer sobre a tese de doutorado elaborada por **GUILHERME BARROSO LANGONI DE FREITAS**, aluno concluinte do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna - Mestrado e Doutorado da Universidade Federal do Paraná, intitulada: “**DESENVOLVIMENTO DE CAPSAICINA NANOENCAPSULADA COM ALBUMINA E AVALIAÇÃO SOBRE O POTENCIAL TERAPÊUTICO ANTITUMORAL**”. A Banca examinadora considerou que o aluno apresentou trabalho adequado para tese, e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título **de Doutor em Medicina Interna**. A banca considerou o trabalho de grande relevância à Saúde Pública, e recomendam a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial depois de incorporadas às sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Dra. Flávia Lada Degaut Pontes 

Dra. Ana Paula Martins Sebastião 

Dra. Fernanda Bovo 

Dr. Luiz Cláudio Fernandes 

Dra. Iara T. de Messias - Reason

## TERMO DE APROVAÇÃO

GUILHERME BARROSO LANGONI DE FREITAS

### DESENVOLVIMENTO DE CAPSAICINA NANOENCAPSULADA COM ALBUMINA E AVALIAÇÃO SOBRE O POTENCIAL TERAPÊUTICO ANTITUMORAL

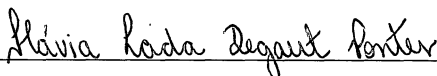
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iara José de Messias-Reason

Orientadora – Departamento de Patologia Médica, UFPR

---



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Lada Degaut Pontes

Departamento de Farmácia, UFPR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Martins Sebastião

Departamento de Patologia Médica, UFPR

---

Dr<sup>a</sup>. Fernanda Bovo

Departamento de Patologia Médica, UFPR

---

Prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes

Departamento de Fisiologia, UFPR



Curitiba, 26 de agosto 2016.

## AGRADECIMENTOS

Não sei se estou terminando uma etapa ou apenas iniciando outra. Contudo, é com grande felicidade e enorme dose de alívio que chego ao final desta tese. Nada seria possível sem a saúde que Deus me proporcionou e as pessoas que ele colocou em meu caminho e, seria injusto se não as agradecesse enormemente.

Aos meus pais, Carlos Augusto e Marilene Barroso, que sempre me mostraram que a força de vontade, dedicação e a moral são as chaves para o sucesso.

Aos meus avós, que sempre foram exemplo de pessoas. Obrigado pela companhia e pelos ensinamentos.

À minha esposa Karina, pelo companheirismo, compreensão e apoio incondicional. Por entender todos os momentos que me ausentei mesmo estando presente, pelas palavras de apoio quando tudo parecia estagnado, por compreender que férias e finais de semana de doutorando e esposa não existem. Enfim, você foi essencial.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Iara Messias, por acreditar no projeto, pela compreensão que muitas vezes as etapas deveriam ser refeitas, por acreditar em mim, pelas conversas de orientação sempre abertas e disponíveis e, por se mostrar acima de tudo um ser humano especial que sabe tratar seus alunos com atenção e carinho.

Ao meu coorientador Prof<sup>o</sup> Dr Najeh Maissar, por disponibilizar o espaço físico do laboratório e equipamentos e por acreditar em mim e no projeto.

Aos professores e amigos Emerson Carraro e Ivo kerppers pelo auxílio com o experimento *in vivo* e ao aluno e hoje amigo, Guilherme Martins, pela dedicação e auxílio.

Um agradecimento especial aos meus primos Vitor e Dudu por me acolherem tantas vezes em sua casa em Niterói. Assim como ao meus novos primos Gustavo e Andreissy por me abrigarem tão bem e pela companhia em Curitiba.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Ricardo Bicca de Alencastro, por me mostrar tudo que sei sobre ser um professor ético, moral e sensível as necessidades dos alunos. Grande parte dessa tese eu dedico a ti.

Pelas análises realizadas agradeço aos Departamentos de Química da UNICENTRO e UFPR, Departamentos de Física e Farmácia da UNICENTRO e ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Aos membros avaliadores da banca, obrigado pelas críticas e disponibilidade.

## RESUMO

O câncer é uma das doenças que mais preocupa a população mundial atualmente e as projeções futuras são alarmantes. A dificuldade no desenvolvimento de tratamentos com menor custo, efetivos e baixo efeito colateral preocupa a devido o risco de pacientes ficarem sem o atendimento adequado. Apostar em produtos naturais com potenciais terapêuticos talvez seja a solução mais viável a curto prazo. Uma das substâncias que vem obtendo boas respostas clínicas é a capsaicina. Ela é um metabólito secundário utilizado como analgésico e anti-inflamatório, porém, com relatos de respostas antitumorais e cancerígenas. A fim de avaliar o potencial terapêutico da capsaicina e melhorar o direcionamento do fármaco apenas para células tumorais, o presente estudo teve o objetivo de desenvolver nanoformulação de albumina bovina com capsaicina. Entretanto, antes de desenvolver a formulação foi necessário validar o método analítico para identificação e quantificação da capsaicina. O mesmo foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência com volume de injeção de 100µL, fase móvel de metanol:água (15:85, v/v), temperaturas da coluna e amostra em 25 °C, coluna fase reversa C18 (25cm X 4mm), tempo de corrida de 8 minutos e leitura da absorbância em 280 nm. A formulação foi desenvolvida por método de dessolvatação-coacervação utilizando meio com pH 7, adição do agente dessolvante (etanol) em 1 mL/min e concentração do reticulante (glutaraldeído) a 8%. Após desenvolver a formulação, a mesma foi validada através de vários métodos analíticos, o que confirmou a estabilidade da formulação (90 dias em ambiente refrigerado) e a reprodutibilidade do método de síntese. As nanopartículas apresentaram forma *quasi*-esférica, diâmetro de aproximadamente 200 nm e baixo índice de polidispersão. Os testes *in vivo* analisaram as alterações ocasionadas sobre parâmetros bioquímicos, hematológicos, histológicos e da expressão de citocinas. Diferentemente dos resultados da literatura, houve um discreto aumento da glicemia para capsaicina livre, no entanto, os outros parâmetros bioquímicos ficaram dentro da normalidade. O hemograma da capsaicina livre apresentou alteração na contagem de % de linfócitos,  $67 \pm 4\%$ , contra  $37 \pm 7$  e  $49 \pm 7\%$  do controle e nanopartículas, respectivamente. Por outro lado, os granulócitos da droga livre tiveram redução ( $21 \pm 2\%$ ), enquanto o controle ( $49 \pm 4\%$ ) e nanopartículas de capsaicina ( $40 \pm 9\%$ ) não tiveram diferença significativa, o que pode representar algum processo inflamatório ou infeccioso. Entretanto, ainda são necessários outros estudos para confirmar alguma hipótese. A análise histológica revelou infiltrados de leucócitos em tecidos pulmonares, sendo esta resposta inflamatória mais intensa com a droga livre. Dentre as citocinas, apenas a expressão de TNF-*alfa* foi influenciada. Esta citocina apresentou menor expressão plasmática nos grupos com capsaicina livre e nanoencapsulada. Os testes *in vivo* demonstraram perfil de segurança devido a ausência de alterações nos exames. Sobre a resposta antitumoral *in vitro*, a nanoformulação obteve excelentes resultados com inibição do crescimento de mais 80% das células B16F10 (modelo de melanoma) na concentração de 250 µg/mL. A IC<sub>50</sub> calculada ficou em 31,25 µg/mL durante incubação de 72h. Ao fim desta etapa de estudo, pode-se concluir que o desenvolvimento da nanopartícula de albumina com capsaicina para fins terapêuticos (anti-tumorais) ocorreu com sucesso. A formulação possui controle no diâmetro, liberação da droga, menor toxicidade ao ser comparada com a droga livre e boa resposta antitumoral *in vitro*.

Palavras-chave: Nanopartículas. Capsaicina. Antitumoral. Toxicidade. Albumina.

## ABSTRACT

Cancer is currently one of the diseases that most concerns the world population and its future projections are alarming. The difficulty in developing effective, with lower costs and side effects treatments is due to the risk of patients being without adequate attendance. To consider natural products with therapeutic potentials may be the most viable solution at short-term. One of the substances that has been obtaining great clinical responses is capsaicin. It is a secondary metabolite utilized as analgesic and anti-inflammatory, however, with reports of antitumor and anti-carcinogenic responses. In order to evaluate the therapeutic potential of capsaicin and improve the drug's targeting to tumor cells, the present study aimed to develop a bovine albumin nanoformulation with capsaicin. Nonetheless, before developing the formulation it was necessary to validate the analytical method to identify and quantify the capsaicin. This procedure was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with injection volume of 100  $\mu$ L, mobile phase of methanol: water (15:85, v/v), column and sample temperature of 25  $^{\circ}$ C, reversed-phase column C18 (25cm X 4mm), trial time of 8 minutes and absorbance reading in 280 nm. The formulation was developed by desolvation/ coacervation method using mean with pH 7, 1 mL/min addition of dissolvent agent (ethanol) and reticulant agent concentration (glutaraldehyde) of 8%. After developing the formulation, it was validated through many analytical methods, which confirmed the stability of the formulation (90 days in a refrigerated environment) and reproducibility of the synthesis method. The nanoparticles presented a quasi- spherical form, diameter of approximately 200 nm and a low polydispersity index. In vivo tests analyzed the alterations caused over biochemical, hematological, histological parameters and over the cytokines expression. Differently from the literature, a small rise in glucose level occurred in the group of free capsaicin, however, the other biochemical parameters remain within the reference range. The hemogram of this free capsaicin group presented alterations in lymphocytes % count  $67 \pm 4\%$ , against  $37 \pm 7$  and  $49 \pm 7\%$  of control and nanoparticles groups, respectively. In contrast, the granulocytes of the free drug group reduced ( $21 \pm 2\%$ ), while the control group ( $49 \pm 4\%$ ) and the nanoparticle one ( $40 \pm 9\%$ ) presented no significant difference, what may represent some inflammatory or infectious process. Still, other studies are necessary to confirm any hypothesis. The histological analysis revealed leukocytes infiltrates in pulmonary tissues, being this inflammatory response more intense with the free drug. Among the cytokines, only the expression of TNF-alfa was influenced. This cytokine showed a lower plasmatic expression in the groups with free and nano encapsulated capsaicin. In vivo tests demonstrated a safe profile due to the absence of alterations in the analyses. About the antitumor response in vitro, the nanoformulation obtained excellent results, inhibiting 80% of B16F40 cells (melanoma mode) in the concentration of 250  $\mu$ g/mL. The IC<sub>50</sub> calculated was 31.5  $\mu$ g/mL during incubation of 72h. In the end of this study stage, it can be concluded that the development of a nanoparticle of albumin with capsaicin to therapeutic purposes (anti-tumor) occurred with success. The formulation has control in diameter and drug release, lower toxicity when compared to the free drug and a good antitumor response in vitro.

Key-words: Nanoparticles. Capsaicin. Antitumor. Toxicity. Albumin.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DA CAPSAICINA ( <i>TRANS</i> -8-METIL-N-VANILIL-6-NONENAMIDA).....	23
FIGURA 2 - TOPOLOGIA DO CANAL DO TRPV1 DESTACANDO OS RESÍDUOS FARMACOFÓRICOS.....	27
FIGURA 3 - INIBIÇÃO DA ANGIOGÊNESE INDUZIDA POR TUMOR <i>IN VIVO</i> . ENSAIO COM O CONTROLE (-), (+) E COM A CAPSAICINA EM QUATRO DOSES DIFERENTES.....	31
FIGURA 4 - CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS INERENTES DO MICROAMBIENTE DE UM TUMOR SÓLIDO.....	38
FIGURA 5 - (A) NANOPARTÍCULA DE ALBUMINA MARCADA COM AMINOFLUORESCENCE (AFLC), DESTACANDO A REGIÃO ACOMETIDA POR ARTRITE. (B) ALBUMINA COMPLEXADA COM EVANS BLUE FLUORESCÊNCIA DESTACANDO A DISTRIBUIÇÃO PARA O TUMOR DE WALKER 256 INOCULADO NA PATA ESQUERDA DO RATO AO LONGO DE 72H.....	41
FIGURA 6 - OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS ATRAVÉS DO MÉTODO DE DESSOLVATAÇÃO-COACERVAÇÃO.....	43
FIGURA 7 - REAÇÃO ENZIMÁTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE URÉIA.....	63
FIGURA 8 - REAÇÕES ENZIMÁTICAS UTILIZADAS NA QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DE CREATININA.....	64
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO DAS DUAS ETAPAS QUE OCORREM PARA QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DO TGP.....	65
FIGURA 10 - ETAPAS REACIONAIS UTILIZADAS PARA QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DO ÁCIDO ÚRICO.....	65
FIGURA 11 - ETAPAS REACIONAIS PARA QUANTIFICAÇÃO DA GLICEMIA.....	66
FIGURA 12 - EUTANÁSIA E RETIRADA DOS ÓRGÃOS (PULMÕES, CORAÇÃO, RINS, BAÇO, FÍGADO E TESTÍCULOS) PARA OS EXAMES HISTOPATOLÓGICOS.....	67
FIGURA 13 - CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DA AMOSTRA DE CAPSAICINA DA GALENA® NA CONCENTRAÇÃO DE 50 µg/mL, FASE MÓVEL ÁGUA:METANOL (85:15, V:V).....	70

FIGURA 14 - A. GRÁFICO DE CLAE DA CAPSAICINA COM 7 CONCENTRAÇÕES DIFERENTES: (A) 200; (B) 100; (C) 50; (D) 25; (E) 10; (F) 2,5; (G) 0,75 µg/mL. B. CURVA ANALÍTICA PARA O LD E LQ.....	76
FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO DO POTENCIAL <i>ZETA</i> DE UMA PARTÍCULA EM SOLUÇÃO.....	85
FIGURA 16 - RELAÇÃO ENTRE O POTENCIAL <i>ZETA</i> (MV) DA ALBUMINA E O VALOR DE PH DO MEIO (NÚMEROS DA COLUNA).....	86
FIGURA 17 - (A) ESPECTRO DE FTIR DA CAPSAICINA LIVRE DESTACANDO OS PRINCIPAIS GRUPOS FUNCIONAIS DA MOLÉCULA RELACIONADA COM AS BANDAS DO ESPECTRO. (B) ESPECTRO DE FTIR PARA AS NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA COM CAPSAICINA.....	87
FIGURA 18 - A. CURVA DSC OBTIDA PARA A AMOSTRA DE CAPSAICINA LIVRE NA FAIXA DE 0 - 250 °C. B. CURVA OBTIDA PARA A AMOSTRA DE CAPSAICINA NANOENCAPSULADA EM ALBUMINA.....	91
FIGURA 19 - AMOSTRA DE NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA COM CAPSAICINA AVALIADA POR MEV.....	93
FIGURA 20 - ANÁLISE DE MET DAS NANOPARTÍCULAS COM CAPSAICINA.....	94
FIGURA 21 - LÂMINAS HISTOLÓGICAS DO BAÇO: (A) CL, (B) NV, (C) NC E MIOCÁRDIO: (D) CL, (E) NV, (F) NC.....	108
FIGURA 22 - LÂMINAS HISTOLÓGICAS DE TECIDO HEPÁTICO: CL (A), NC (B), NV (C) E PULMONAR: CL (D), NV (E) E NC (F).....	110
FIGURA 23 - LÂMINAS DOS EXAMES HISTOLÓGICOS DE RINS: CL (A), NC (B), NV (C) E TESTÍCULO: CL (D), NC (E) E NV (F).....	111
FIGURA 24 - RESULTADO MICROSCÓPICO DOS TESTES DE VIABILIDADE CELULAR.....	114

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - OS 10 PAÍSES QUE MAIS CONTRIBUÍRAM PARA PUBLICAÇÕES, PATENTES E NA PESQUISA POR NOVOS FÁRMACOS NATURAIS NO ANO DE 2013.....	23
TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DE CAPSAICINA ADMINISTRADA EM RATOS POR V.O.....	26
TABELA 3 - NOVAS NANOFORMULAÇÕES APROVADAS RECENTEMENTE PELA FDA.....	39
TABELA 4 - PARÂMETROS UTILIZADOS NO ESTUDO DE DELINEAMENTO FATORIAL.....	53
TABELA 5 - CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS EM CADA TUBO AO TÉRMINO DA DILUIÇÃO.....	61
TABELA 6 - ENSAIO DE PRECISÃO POR REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA AS AMOSTRAS DE CAPSAICINA EM 4 CONCENTRAÇÕES DIFERENTES (10, 25, 50 E 100 µg/mL).....	73
TABELA 7 - PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO E +-DPR OBTIDO NAS ANÁLISES DE ROBUSTEZ APÓS MODIFICAÇÕES NA TEMPERATURA E NA VELOCIDADE DE FLUXO (mL/min) (N = 3).....	74
TABELA 8 - FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS PELO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	78
TABELA 9 - EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (%) DA CAPSAICINA NAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS EM PH IGUAL A 7.....	80

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - NÚMERO DE APROVAÇÕES NA FDA DE NOVOS FÁRMACOS PARA TRATAMENTO CONTRA O CÂNCER DE 2005 A 2014.....	21
GRÁFICO 2 - CURVA ANALÍTICA DA CAPSAICINA EM METANOL:ÁGUA (85:15, V/V) NAS CONCENTRAÇÕES DE 200, 100, 50, 25, 10 E 5 µg/mL.....	71
GRÁFICO 3 - AVALIAÇÃO DOS VALORES DE DIÂMETRO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO DAS NANOPARTÍCULAS FORMADAS A PARTIR DA ANÁLISE FATORIAL CALCULADAS POR DLS.....	79
GRÁFICO 4 - PERFIL DE ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS ESTOCADAS EM TRÊS AMBIENTES DIFERENTES AO LONGO DE 3 MESES.....	82
GRÁFICO 5 - PERFIL DE LIBERAÇÃO DA CAPSAICINA DURANTE AS 12 SEMANAS ANALISADAS.....	83
GRÁFICO 6 - DIFRATOGRAMA DO DRX DA CL (AZUL) E NA FORMA DE NC (AMARELO).....	89
GRÁFICO 7 - AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DA CAPSAICINA LIVRE (CL) E NANOENCAPSULADA (NC) (CONCENTRAÇÕES DE 98, 43, 25 e 10 µg/mL) E, DA ALBUMINA VAZIA(NV) DENTRO DA FAIXA DE TEMPO DE ½ ATÉ 72 h.....	96
GRÁFICO 8 - RESULTADO DA LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA CAPSAICINA DENTRO DE UM PERÍODO DE 72h.....	98
GRÁFICO 9 - VALORES DOS EXAMES BIOQUÍMICOS REPRESENTADOS EM MÉDIA +- DP.....	102
GRÁFICO 10 - VALORES MÉDIOS COM DP PARA OS EXAMES HEMATOLÓGICOS DIVIDIDOS EM 3 GRÁFICOS: A. GB, GV, HGB, HCT, VGM, MCH E MCHC; B. PLA; C. % DE LYM, MON E GRA.....	104
GRÁFICO 11 - VALORES MÉDIOS DAS CITOCINAS TNF- <i>ALFA</i> , IFN, IL-4 E IL-2 PARA OS GRUPOS CL, NC E NV.....	105
GRÁFICO 12 - RESULTADO DO TESTE DE VIABILIDADE DAS CÉLULAS B16F10 MENSURADA EM TRÊS TEMPOS (24, 48 E 72h).....	112

## LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 - FÓRMULA UTILIZADA PARA DETERMINAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA AMOSTRA NO TESTE DE EXATIDÃO.....	51
EQUAÇÃO 2 - FÓRMULAS UTILIZADAS PARA CALCULAR O LD (A) LQ (B).....	52
EQUAÇÃO 3 - FÓRMULA UTILIZADA PARA O TESTE DE TUKEY.....	54
EQUAÇÃO 4 - FÓRMULA PARA DETERMINAR A EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	54
EQUAÇÃO 5 - FÓRMULA UTILIZADA PARA CALCULAR O POTENCIAL ANTIOXIDANTE NO MÉTODO DE RADICAL ABTS.....	58

## LISTA DE SIGLAS

AIF - Fator de indução apoptótica  
ALT - Alanina amino transferase  
ATP - Adenosina trifosfato  
Bcl-2 - Célula-B de linfoma 2  
BSA - Albumina sérica bovina  
B16-F10 - Linhagem celular de melanoma de camundongo  
CaMkII - Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina  
CBA - *Cytometric Bead Array*  
CL - Capsaicina livre  
DL<sub>50</sub> - Dose letal para 50%  
DLS - *Dynamic Light Scattering*  
DRX - Difração de raios-X  
EGTA - ácido etileno glicol-bis ( $\beta$ -amino-etil-éter)  
EPR - Efeito de permeabilidade e retenção aumentadas  
ERO - Espécies reativas de oxigênio  
EUA - Estados Unidos da América  
FDA - *Food and Drug Administration*  
GOD - Glicose oxidase  
GPT - *Glutamate-pyruvate transaminase*  
HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência  
HSA - Albumina sérica humana  
HTS - High-throughput screening  
HUVEC - Células endoteliais da veia umbilical humana  
IC50 - Concentração inibitória para 50%  
IFN- $\gamma$  - Interferon-*gama*  
IFN $\gamma$ R1 - Receptor de Interferon gama do tipo 1  
IFN $\gamma$ R2 - Receptor de Interferon gama do tipo 2  
IL-2R - Receptor de interleucina-2  
IL-2 - Interleucina-2  
IL-4 - Interleucina-4  
IL-6 - Interleucina-6

IL-8 - Interleucina-8  
LD - Limite de detecção  
LNCaP - Células do câncer de próstata  
LPS - Lipopolissacarídeos  
LQ - Limite de quantificação  
mAbs - Anticorpos monoclonais  
MAPK - Proteínas quinases ativadas por mitógenos  
MHC - Moléculas do fator de histocompatibilidade maior  
NFkB - Fator de transcrição NF *kappa* B  
NC - Nanopartícula de capsaicina  
NK - Natural killer  
NV - Nanopartícula vazia  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
ONU - Organização das Nações Unidas  
PI3K - Fosfoinosítídeo 3-quinase  
PKA - Proteína quinase A  
PKC - Proteína quinase C  
PPAR *gamma* - Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama  
Ser 505 - Serina na posição 505  
S3 - Subunidade 3  
S4 - Subunidade 4  
TGP - Transaminase Glutâmico Pirúvica  
Thr 550 - Treonina na posição 550  
TNF-*alfa* - Fator *alfa* de necrose tumoral  
TNFR - Receptores de TNF-*alfa*  
TNFR1 - Receptor do fator de necrose tumoral do tipo 1  
TNFR2 - Receptor do fator de necrose tumoral do tipo 2  
Treg - Células T regulatórias  
TRPV - Receptor vanilóide de potencial transiente  
 $t_{1/2}$  - Tempo de meia-vida  
VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial  
v.o. - Via oral  
%EE - % da eficiência da encapsulação

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1 CÂNCER.....	18
1.1.1 EPIDEMIOLOGIA.....	18
1.1.2 TRATAMENTOS, NA CONTRA-MÃO DA ACESSIBILIDADE.....	19
1.1.3 QUÍMICA MEDICINAL DE PRODUTOS NATURAIS - CAPSAICINA, UMA POSSIBILIDADE?.....	21
1.1.4 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO ANTITUMORAIS DA CAPSAICINA.....	25
1.1.5 RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS E CÂNCER.....	32
1.1.6 CARACTERÍSTICA DAS CÉLULAS TUMORAIS, UM ALVO PARA NANOFÁRMACOS .....	37
1.1.7 NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA.....	40
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>45</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
3.1 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS, ANIMAIS E CÉLULAS.....	46
3.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	49
3.2.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	50
3.3 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	52
3.3.1 DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS.....	52
3.3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS.....	54
3.3.2.1 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (%EE).....	54
3.3.2.2 DIÂMETROS E MORFOLOGIA DAS NANOPARTÍCULAS.....	55
3.3.2.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX).....	55
3.3.2.4 ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (EI-TF).....	56
3.3.2.5 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC) .....	56
3.3.2.6 POTENCIAL ZETA (PZ) .....	56
3.3.2.7 ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS.....	56



3.3 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DA CAPSAICINA.....	57
3.3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	57
3.3.2 LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	58
3.4 ESTUDOS <i>IN VIVO</i> .....	59
3.4.1 EXPRESSÃO DE CITOCINAS.....	59
3.4.2 ESTUDOS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS.....	62
3.4.2.1 ANÁLISES DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	62
3.4.2.1.1 URÉIA.....	62
3.4.2.1.2 CREATININA.....	63
3.4.2.1.3 TGP.....	64
3.4.2.1.4 ÁCIDO ÚRICO.....	65
3.4.2.1.5 GLICOSE.....	65
3.4.2.2 ANÁLISES DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	66
3.4.3 ESTUDOS HISTOLÓGICOS.....	66
3.5 AVALIAÇÃO ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i> .....	67
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	69
4.1.1 LINEARIDADE.....	70
4.1.2 EXATIDÃO.....	71
4.1.3 PRECISÃO.....	72
4.1.4 ROBUSTEZ.....	73
4.1.5 SELETIVIDADE.....	74
4.1.6 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	75
4.2 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	76
4.2.1 AVALIAÇÃO DO DIÂMETRO DAS NANOPARTÍCULAS DE CAPSAICINA.....	77
4.2.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (%EE).....	79
4.2.3 ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS.....	81
4.3 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS.....	84
4.3.1 POTENCIAL <i>ZETA</i> (PZ).....	84
4.3.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	86

4.3.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX).....	89
4.3.4 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	90
4.3.5 MICROSCOPIA.....	92
4.4. ESTUDOS <i>IN VITRO</i> - LIBERAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	95
4.5 ESTUDOS <i>IN VIVO</i> .....	98
4.5.1 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA.....	100
4.5.2 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO SANGUE.....	104
4.5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA TOXICIDADE.....	106
4.6 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTITUMORAL.....	112
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>115</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>117</b>
<b>7 ANEXO I: PUBLICACOES E DIVULGAÇÕES DO TRABALHO.....</b>	<b>140</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CÂNCER

#### 1.1.1 EPIDEMIOLOGIA

Estudo realizado em 2011, relatou que indivíduos acima dos 65 anos compunham 8% da população mundial, porém projeções realizadas preveem que esta proporção dobre até 2050 (BIDB, 2011), ou mesmo atinjam até 30% da população local, no caso da Europa (REBER et al., 2012). Estas estatísticas são reforçadas por dados da Organização Mundial de Saúde, OMS (WHO, 2015), os quais destacam o aumento da expectativa de vida em todos os continentes e faixas sociais ao redor do mundo. Consequentemente, as pessoas mais idosas tendem a representar uma proporção cada vez maior da população.

Doenças não transmissíveis cujas incidências estão aumentando rapidamente, *e.g.* doenças cardíacas (RAPSOMANIKI et al., 2014), diabetes (CASPERSEN et al., 2012), demência (CAO et al., 2010; TOLEDO et al., 2013) e câncer, têm como grupo de risco indivíduos idosos. Nos Estados Unidos da América (EUA) constatou-se grande incidência (> 50%) e mortes relacionadas ao câncer (70% dos óbitos) em pacientes acima dos 65 anos de idade. (ALTEKRUSE et al., 2012). Porém, projeta-se um quadro ainda mais crítico para 2030, quando 70% de todos os casos diagnosticados ocorrerão em idosos. (SMITH et al., 2009).

Este aumento da longevidade somado ao acesso à melhores condições de vida em países considerados subdesenvolvidos têm causado preocupação quanto ao nível de crescimento demográfico mundial, o provável aumento da prevalência de doenças crônicas e o acesso universal aos medicamentos (NIKOLICH-ŽUGICH et al., 2015). Em 2013, a Organização das Nações Unidas (ONU) divulgou que a população mundial atingiu 7,2 bilhões de pessoas com uma projeção assustadora para 2050, quando o planeta Terra acomodará 9,6 bilhões de habitantes (ONU, 2015). Portanto, com o crescimento populacional esperado e o proporcional aumento no número de idosos, fração da população que necessita de maiores cuidados médicos (KASKIE et al., 2011; THOMPSON; DALE, 2012; THOMPSON; DALE, 2015; BELLIZZI et al., 2008), torna-se necessário e urgente o acesso a tratamentos medicamentosos com custo-eficácia comprovados, baixa toxicidade, programas de saúde pública de prevenção e intervenção, além do avanço na compreensão das patologias.

Dentre as várias doenças destacadas como prioridade pela OMS, o câncer é considerado o maior problema de saúde pública em muitos países. Atualmente ele é a segunda causa de morte nos países desenvolvidos e espera-se que em poucos anos ultrapasse as doenças cardiovasculares (SIEGEL et al., 2015). Segundo o *Cancer Research UK*, em 2012 este grupo complexo de doenças neoplásicas malignas acometia 14,1 milhões de pessoas em todo mundo e o número de óbitos chegou a aproximadamente 8,2 milhões (Cancer Research UK, 2012). Acredita-se que estes números atinjam cifras ainda maiores, devido à enorme quantidade de casos não relatados ou diagnosticados, principalmente em países subdesenvolvidos (FRIEDRICH et al., 2015; DIAMANT et al., 2009) e a situação é mais alarmante se considerarmos os casos de morbidades.

No Brasil, a estimativa para o biênio 2014-2015, aponta para a ocorrência anual de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, o que reforça a magnitude do problema e se sujeita a sobrecarregar ainda mais o serviço de saúde no país (INCA, 2014). A partir destes dados, é incontestável que o câncer hoje é um problema de saúde pública mundial e, portanto, necessita maiores investimentos em pesquisa para alcançar novos medicamentos e diagnósticos acessíveis a todos.

### 1.1.2 TRATAMENTOS, NA CONTRA-MÃO DA ACESSIBILIDADE

Ao se deparar com estas estatísticas e as projeções mundiais de novos casos de câncer, há de se imaginar que as pesquisas de promissores tratamentos, que aliem redução de custos e dos efeitos colaterais além do aumento na eficácia, têm sido prioridade das grandes indústrias farmacêuticas e centros de pesquisa. Com o avanço nos campos da biotecnologia, estratégias de química medicinal e de métodos analíticos, tornou-se possível identificar uma grande quantidade de alvos farmacológicos e, com isso, planejar desde pequenos fármacos até terapias complexas e custosas como os anticorpos monoclonais (mAbs, *targeted drugs*).

Na grande maioria dos casos, o tratamento anti-câncer exige abordagem multidisciplinar que combina cirurgia, quimioterapia e radioterapia, sendo a quimioterapia citotóxica um pilar neste cenário (VASSILAKOPOULOU et al., 2016). Entretanto, por lesionar também células sadias, os fármacos quimioterápicos geram grande quantidade de efeitos colaterais. Esta toxicidade dos fármacos sobre o organismo pode resultar desde alterações estéticas, *e.g.* queda de cabelo e alteração na cor de tecidos (SEGAERT et al., 2005; VOGELZANG et al., 1985), até quadros funcionais graves como infertilidade

(VASSILAKOPOULOU et al., 2015; LEVINE et al., 2015), alterações hormonais (ANDERSON et al., 2006; CROFTON et al., 1998), neurotoxicidade (STONE; ANGELIS, 2016) e, até mesmo, o surgimento de novos tumores malignos, os chamados cânceres secundários (ARNON et al., 2001; LEE et al., 2012).

Por outro lado, as estratégias mais modernas abordam avanços dentro do campo da biotecnologia direcionadas para a obtenção de anticorpos cada vez mais seletivos (SCOTT et al., 2012). Desde a descrição inicial da produção dos mAbs empregando tecnologia hibridoma (KÖHLER; MILSTEIN, 1975) significantes avanços na aplicabilidade dentro da prática clínica foram obtidos (GESKIN, 2015). Modificações estruturais foram realizadas para melhorar a especificidade dos anticorpos e aumentar a seletividade citotóxica. Realmente, quando comparados os efeitos tóxicos observados em um paciente tratado com quimioterápicos tradicionais com outro que recebeu apenas o tratamento do anticorpo percebe-se uma evidente redução de muitos eventos tóxicos (SONG et al., 2012).

É óbvio que as terapias biotecnológicas com mAbs revolucionaram o tratamento contra o câncer e forneceram grandes benefícios aos pacientes. Entretanto, o elevado custo do tratamento quando comparado aos quimioterápicos tradicionais gera problema na saúde pública de muitos países, principalmente os mais carentes. Esta preocupação se justifica ainda mais quando se avalia as projeções futuras supracitadas de crescimento populacional. Todavia, até mesmo países com melhores condições financeiras têm se preocupado com este possível descontrole das contas públicas, caso a maior parte do tratamento provenha de medicamentos biotecnológicos (FLEEMAN et al., 2011; HOYLE et al., 2013; SHIROIWA et al., 2007; SHIROIWA et al., 2010), com isso, esta discussão está mais atual do que nunca. Apesar da extensa literatura científica sobre o assunto ainda não há consenso sobre a introdução da terapia com anticorpos e o custo-efetividade para a sociedade e pacientes.

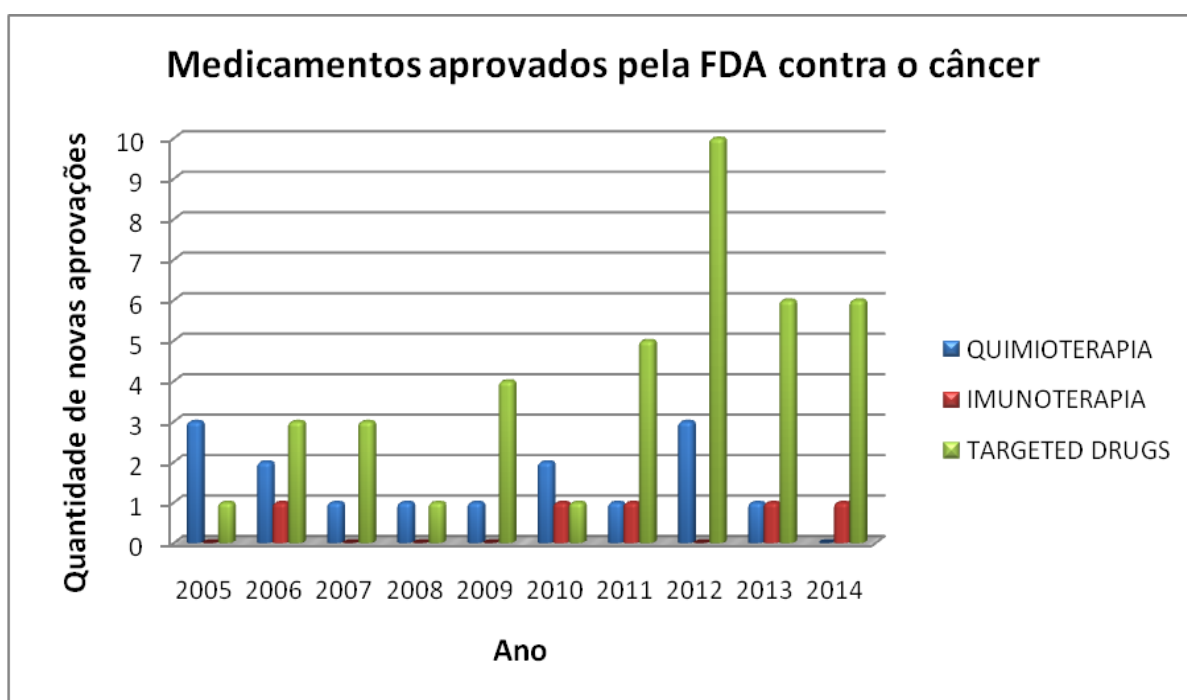
Atualmente, há 47 medicamentos utilizando anticorpos monoclonais aprovados pela Food Drug Administration (FDA) para o tratamento de diversas doenças, em sua grande maioria inflamação e câncer. Caso a aprovação destes medicamentos se mantenha dentro da média atual de 4 novos mAb por ano, chegaremos em 2020 com cerca de 70 anticorpos monoclonais disponíveis no mercado farmacêutico com faturamento próximo de 125 bilhões de dólares (LEVINE et al., 2015).

O maior ganho financeiro por parte das indústrias farmacêuticas ao comercializar medicamentos biotecnológicos gerou enorme interesse no desenvolvimento de mAbs para câncer e a menor aplicação de técnicas clássicas para desenvolvimento de novos fármacos, o

que produziu um resultado inédito. Em 2014, nenhum novo fármaco quimioterápico foi aprovado pela FDA, enquanto seis novos anticorpos tornaram-se disponíveis, conforme ilustrado no GRÁFICO 1. (FDA, 2016).

Caso esta tendência permaneça, em breve haverá uma crise na política de saúde pública, principalmente nos países menos desenvolvidos. Talvez a solução da carência de novos fármacos esteja na fonte mais simples e eficiente de descoberta de novas substâncias bioativas, os produtos naturais. (NEWMAN; CRAGG, 2012).

GRÁFICO 1. NÚMERO DE APROVAÇÕES NA FDA DE NOVOS FÁRMACOS PARA TRATAMENTO CONTRA O CÂNCER DE 2005 A 2014.



Fonte: FDA (2016).

### 1.1.3 QUÍMICA MEDICINAL DE PRODUTOS NATURAIS - CAPSAICINA, UMA POSSIBILIDADE?

O custo de pesquisa e desenvolvimento de um novo medicamento é considerado elevadíssimo. Isso se deve ao grande número de insucessos que ocorre neste tipo de pesquisa proveniente de vários fatores como, efeitos colaterais insustentáveis, problemas farmacocinéticos e dinâmicos, além da dificuldade de síntese em grande escala da substância bioativa (ALLISON, 2012). No entanto, ao observar a evolução dos custos ao longo dos anos é possível perceber que houve um crescente acréscimo nestes valores justificados com a

introdução cada vez maior de medicamentos biotecnológicos e técnicas não-clássicas de desenvolvimento de fármacos, por exemplo, química combinatória e *screening* de alvos e moléculas. Logicamente que esta elevação se refletirá nas cifras que os países e consumidores deverão desembolsar para ter acesso aos tratamentos. Uma maneira tradicional e de sucesso para tentar reduzir estes custos é apostar em planejamentos racionais diretos e indiretos de novas entidades químicas com atividade biológica a partir de produtos naturais (KOEHN; CARTER, 2005).

Os produtos naturais (PNs) provenientes de plantas sempre foram considerados excelentes fontes de protótipos para tratar inúmeras doenças (NEWMAN; CRAGG, 2012). O próprio tratamento de tumores malignos ainda é e, provavelmente será por muito tempo, dependente destes metabólitos secundários. Fármacos altamente utilizados e com custo-efetividade comprovados como os taxanos (paclitaxel e docetaxel), alcalóides da vinca (vincristina, vimblastina, vindesina e vinorelbina), derivados da epidofilotoxina (etoposídeo) e derivados da camptotecina (topotecano e irinotecano) reforçam a necessidade de não se abandonar a pesquisa sobre metabólitos secundários potencialmente terapêuticos. Apesar disso, a partir do final do século passado houve redução do interesse pelas indústrias farmacêuticas devido ao surgimento de terapias específicas, que dependem de anticorpos ou pequenas moléculas sintéticas identificadas pela triagem de alto rendimento (*high-throughput screening* - HTS) (BASMADJIAN et al., 2014). O HTS é uma técnica automatizada, extremamente custosa e que ainda apresenta grande desconfiança sobre seus resultados (MACARRON et al., 2011). Embora as terapias direcionadas melhorem grandemente o tratamento de algumas neoplasias, o benefício manteve-se decepcionante para muitos tumores sólidos, o que revitaliza o interesse nos PNs.

Pesquisa realizada por Du & Tang (2014), avaliou o número de publicações, patentes, novos projetos de pesquisa e fármacos provenientes de produtos naturais dividindo os resultados em três intervalos de tempo (1965-1990; 1991-2002; 2003-2013). Há de imaginar que o Brasil tenha, devido sua enorme diversidade biológica, uma posição de destaque na pesquisa de produtos naturais, porém, infelizmente isso ainda está muito longe de ser realidade. Se avaliarmos os dados deste estudo no ano de 2013, o Brasil não figura nem entre os 10 primeiros países (TABELA 1) (DU; TANG, 2014).

Como o número de patentes e publicações científicas indica o grau de inovação de um país e, conseqüentemente, o quanto ele tende a ser competitivo para o futuro, é necessário que os projetos de pesquisa se voltem urgentemente para estes dois temas.

TABELA 1. OS 10 PAÍSES QUE MAIS CONTRIBUÍRAM PARA PUBLICAÇÕES, PATENTES E NA PESQUISA POR NOVOS FÁRMACOS NATURAIS NO ANO DE 2013.

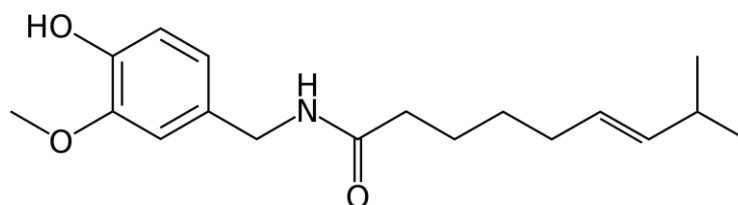
Publicações (WoS)			Patentes (DII)		Fármacos (aprovados ou em teste clínico, Cortellis)	
Países	Publicações	%	Países	Patentes	Origem da Companhia/Inst	Companhia (Univ/Inst.)
China	1971	25,94	China	271	EUA	13 (9)
EUA	1626	21,40	EUA	150	Japão	8 (1)
Japão	609	8,02	Coreia do Sul	64	China	4 (3)
Coreia do Sul	331	4,36	Canadá	44	Coreia do Sul	4 (1)
Taiwan	230	3,03	Taiwan	24	Taiwan	3 (1)
Índia	215	2,83	Alemanha	23	Áustria	2
Alemanha	212	2,79	Rússia	18	Canadá	2
Tailândia	129	1,70	Índia	16	Indonésia	2
França	132	1,74	Austrália	15	Noruega	2
Reino Unido	127	1,67	Reino Unido	15	Tailândia	1 (1)

Nota: WOS (Web of Science), DII (Derwent Innovations Index), UNIV/INST (Universidades/Instituições), EUA (Estados Unidos da América).

Fonte: Adaptado de DU; TANG (2014).

Seguindo esta linha de pensamento, uma das substâncias que tem apresentado grande potencial terapêutico e atraído cada vez mais atenção é a capsaicina (FIGURA 1). Este metabólito secundário é o principal componente picante das frutas de plantas do gênero *Capsicum*, membros da família Solanaceae (PERRY et al., 2007).

FIGURA 1. ESTRUTURA QUÍMICA DA CAPSAICINA (TRANS-8-METIL-N-VANILIL-6-NONENAMIDA).



Plantas do gênero *Capsicum* são nativas das Américas e cultivadas para serem utilizadas como parte da dieta local desde 7500 a.C (PERRY et al., 2007). Em 1816, a capsaicina foi extraída pela primeira vez na forma cristalina e parcialmente purificada (PEREIRA, 1854), entretanto, somente 22 anos depois a forma pura foi obtida. (THRESH,



1876). Vários análogos da capsaicina foram identificados de espécies vegetais de pimentas e o conjunto destes metabólitos é conhecido como capsaicinóides. Porém, nenhum deles alcançou os efeitos biológicos observados pela capsaicina (SRINIVASAN, 2015).

Um número expressivo de estudos sugerem que a capsaicina possui propriedades hipolipidemiante (SRINIVASAN et al., 2004), antioxidante (REDDY; LOKESH, 1992), anti-inflamatória (REDDY; LOKESH, 1994; JOE; LOKESH, 1997) e analgésica (DEAL et al., 1991; MCCARTHY; MCCARTY, 1992). Outros resultados sugerem que ela possa induzir o ciclo celular de detenção ou apoptose, ou ainda inibir a proliferação em uma variedade de células cancerosas, indicando potentes atividades quimiopreventivas (BODE; DONG, 2011; ZHANG et al., 2003; BROWN et al., 2010; DÍAZ-LAVIADA, 2010; SANCHES et al., 2006).

Apesar de indícios apoiarem o papel quimiopreventivo da capsaicina em modelos de cultura de células cancerosas, há outros trabalhos que associam o consumo da capsaicina e o aparecimento de células tumorais e mutagenicidade. Nagabhushan e colaboradores (1985) relataram atividade mutagênica relacionada à capsaicina por testes *in vitro*. Foi observada uma relação entre o aumento na viabilidade e proliferação das células do câncer de próstata (LNCaP) e a maior expressão de receptores andrógenos via fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) em cobaias tratadas com capsaicina (MALAGARIE-CAZENAVE et al., 2009).

Estudos *in vivo* também têm demonstrado resultados ambíguos. Vários deles descrevem efeitos carcinogênicos relacionados com extratos de pimenta ou com a capsaicina isolada (SERRA et al., 2002; LÓPEZ-CARRILLO et al., 1994; HOCH-LIGETI, 1951; TOTH; GANNETT, 1992; JANG et al., 1991; AGRAWAL et al., 1986). Todavia, contrariando estas pesquisas, em avaliações mais recentes e com grupos experimentais mais controlados a capsaicina aparentemente inibe o crescimento e induz apoptose de células tumorais (ZHANG et al., 2003; BROWN et al., 2010; DÍAZ-LAVIADA, 2010; SANCHEZ et al., 2006; ITO et al., 2004; BUIATTI et al., 1989; DASGUPTA et al., 1998), além de não resultar em aumento na incidência de lesões preneoplásicas e neoplásicas (CHANDA et al., 2007; GRAHAM et al., 1988). Park e Surh (1997) observaram que a aplicação tópica de forma crônica da capsaicina, além de não promover o crescimento de tumores locais, inibe a formação de papiloma induzido quimicamente. Porém, as respostas biológicas da capsaicina sobre células tumorais e saudáveis ainda geram muitas discussões e dúvidas.

As discrepâncias enormes entre os estudos *in vivo* e *in vitro* podem ser justificadas por apresentarem severas limitações, tais como imprecisões estatísticas de algumas análises, potenciais erros de classificação de exposição, baixo controle de fatores externos e conclusões especulativas (NOTANI et al., 1987; ARCHER; JONES, 2002; LEE; PARK, 2003). Apesar destas limitações, os estudos são citados continuamente na literatura sendo, por conseguinte, necessária uma precisa investigação dos possíveis efeitos pró- e anti-tumorais e dos mecanismos de ação da capsaicina.

#### 1.1.4 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO ANTITUMORAIS DA CAPSAICINA

Estudos recentes sobre a toxicidade da capsaicina demonstram grandes diferenças dependendo da rota de exposição. A administração por via oral e tópica geram valores de dose letal para 50% do indivíduos ( $DL_{50}$ ) em camundongos de 190 e 500 mg/kg, respectivamente, enquanto a utilização das rotas intravenosa e intratecal produzem valores de 0,56 e 1,6 mg/kg, respectivamente (GLINSUKON et al., 1980). Isso claramente se deve ao efeito de primeira passagem e as barreiras biológicas, que reduzem significativamente a quantidade de capsaicina biodisponível por via oral. Após a administração aguda de doses letais, a morte ocorre de forma rápida com quadro de convulsão seguido por disfunção cardiovascular e pulmonar. O uso rotineiro de produtos contendo capsaicinóides por um grande número de pessoas sugere uma certa segurança desses produtos sob condições normais de via tópica e oral. Entretanto, cenários de exposição extrema resultam em toxicidade aguda, injúria severa, podendo evoluir para quadros fatais (HECK, 1995; STEFFEE et al., 1995; BILLMIRE et al., 1996; BUSKER; VAN HELDEN, 1998; SMITH; STOPFORD, 1999; OLAJOS; SALEM, 2001).

As características farmacocinéticas da capsaicina merecem atenção, pois influenciam diretamente na dose-resposta deste metabólito. Ela demonstra um perfil de distribuição tecidual em ratos por via oral, com acúmulo característico no intestino e no fígado e, menos do que 1% de excreção urinária entre do tempo avaliado (TABELA 2) (SURESH; SRINIVASAN, 2010). Evidentemente, esta distribuição centralizada reduz a biodisponibilidade da capsaicina em outros tecidos do corpo, diminuindo a eficácia de um possível tratamento antitumoral sistêmico.

TABELA 2. DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DE CAPSAICINA ADMINISTRADA EM RATOS POR V.O.

T (horas)	Soro (µg/ml)	Sangue*	Fígado**	Ríns**	Intestino**
1	1,90 +- 0,18	11,11 +- 1,05	24,7 +- 2,1	3,61 +- 0,32	1057,0 +- 157,0
3	1,47 +- 0,09	8,59 +- 0,53	44,7 +- 3,37	5,71 +- 0,33	700,2 +- 42,2
6	0,83 +- 0,10	4,85 +- 0,59	14,8 +- 1,50	6,73 +- 0,45	249,3 +- 24,0
24	0,05 +- 0,01	0,29 +- 0,06	8,71 +- 2,55	3,35 +- 0,45	43,5 +- 3,75
48	0,006 +- 0,001	0,035 +- 0,006	0,60 +- 0,03	0,48 +- 0,09	1,14 +- 0,21
96	0,00	0,00	0,045 +- 0,005	0,00	0,72 +- 0,01
192	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Nota: Valores médios +- SEM de 6 ratos. Capsaicina foi administrada por v.o. para ratos na dose de 30 mg/Kg de peso corporal. \* µg/sangue total e \*\* µg/tecido total.

Fonte: Suresh; Srinivasan (2010).

Outro problema farmacocinético pertinente à capsaicina é a alta taxa de metabolização por enzimas hepáticas da família do citocromo P450, *i.e.* CYP2E1, 1A2, 1A1, 3A4, 2B6, 2C8, 2C9, e 2C19 (REILLY et al., 2003). Com isso, ocorre redução do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), apenas 25 minutos por via oral e 98 minutos quando administrada por via transdérmica. Este perfil metabólico reduz drasticamente a fração biodisponível, prejudicando a citotoxicidade e, consequente indução de apoptose sobre células tumorais (REILLY; YOST, 2006). Porém, os problemas ocasionados pelo metabolismo da capsaicina vão além da queda de eficácia ou redução do tempo de meia-vida.

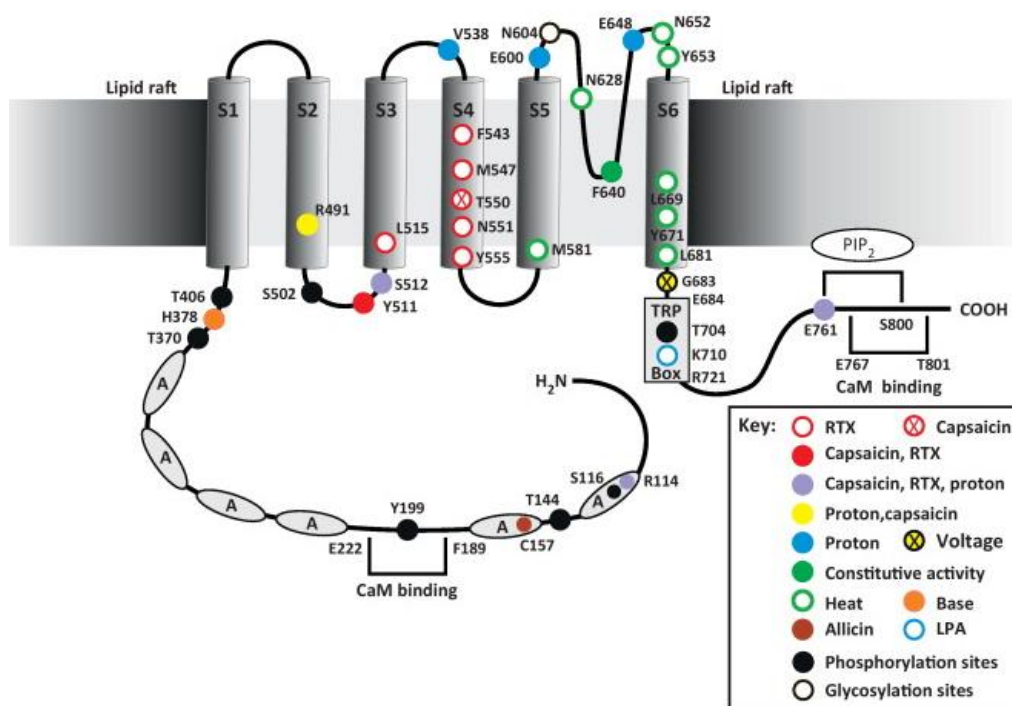
Alguns estudos exploram a relação entre o metabolismo da capsaicina e a toxicidade sobre células saudáveis produzida por seus metabólitos, mas os resultados ainda são conflitantes. Observou-se que a bioativação de capsaicinóides pela fração microsomal S9 do fígado produz metabólitos ativos capazes de induzir alterações mutagênicas em *Salmonella typhimurium* (cepas TA98, TA100, TA1535), células V79 de hamster, formação de micronúcleos em camundongos e aberrações cromossômicas em linfócitos humanos (SURH; LEE, 1995; IVERSON et al., 1995; REILLY; YOST, 2006).

A capsaicina é considerada uma molécula bioativa multialvos, alguns bem definidos e outros ainda sob investigação. Muitos dos efeitos biológicos desencadeados são modulados por receptores de potencial transiente vanilóide (TRPVs), também conhecidos como canais catiônicos não-seletivos termossensíveis. Os TRPVs são receptores homólogos que

demonstram como característica terciária a presença de 6 *loops* transmembrânicos e um *loop* poro entre as subunidades S5 e S6 (FIGURA 2), o qual permite a entrada de cátions (SZOLCSÁNYI; SÁNDOR, 2012).

O primeiro receptor da família vanilóide a ser sequenciado foi o TRPV1, que se caracteriza como sendo canal não seletivo de cátions relacionado com importantes alterações fisiológicas como analgesia, proliferação celular, inflamação e estresse oxidativo. Este receptor pode ser ativado por diversos fatores, sejam eles físicos (aumento da temperatura e pressão) e químicos, *e.g.* anandamida, produtos da lipooxigenase, alteração de pH (meio básico e ácido), capsaicina, dentre outros (GUNTHER et al., 2002; DHAKA et al., 2009). A FIGURA 2 destaca os resíduos farmacofóricos para diversos agonistas do TRPV1.

FIGURA 2. TOPOLOGIA DO CANAL DO TRPV1 DESTACANDO OS RESÍDUOS FARMACOFÓRICOS.



Nota: TRP, domínio do potencial transiente vanilóide conservado para os canais TRP necessários para a ativação do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>); os círculos pretos representam locais de fosforilação envolvidos na ação de sensibilização da proteína quinase C (PKC) e proteína quinase A (PKA).

Fonte: Adaptado de Szolcsányi; Sandor (2012).

A capsaicina é considerada agonista intracelular do TRPV1, pois para ativar o receptor ela necessita penetrar na membrana celular e interagir com região conhecida como *vanilloid-pocket* formado pelos resíduos Ser 505 e Thr 550 presentes nos domínios transmembrânicos S3 e S4 (PAPAKOSTA et al., 2011). Ao interagir com TRPV1 a capsaicina promove uma

sensação inicial de ardência seguida por um longo período de dessensibilização nociceptora no local da interação. A obscuridade sobre estes efeitos começou a ser resolvida quando Porszasz e Jancso (1959) relataram que a capsaicina excitava seletivamente uma subpopulação de fibras sensoriais primárias, as quais conseguem ser ativadas por estímulos nocivos e rapidamente sensibilizadas pela exposição à capsaicina. Entretanto a interação com este receptor pode gerar muitas outras alterações como inflamação neurogênica, dor, hiper-reflexia visceral e até mesmo câncer. Estes efeitos são mediados pela ampla distribuição tecidual dos receptores e devido as respostas celulares variadas.

Os mecanismos celulares que coordenam as respostas biológicas da capsaicina surgem pela fosforilação em cascata de proteínas de sinalização intracelular e da entrada de cátions. O TRPV1 possui vários sítios de fosforilação específicos para proteína quinase A (PKA) (MOHAPATRA; NAU, 2003), proteína quinase C (PKC) (BHAVE et al., 2003) e proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMkII) (JUNG et al., 2004), sendo esta última apontada como a responsável pela dessensibilização do receptor (NUMAZAKI et al., 2003). Além da ampla distribuição dos receptores, que contraria a especificidade sobre fibras neuronais que de início se imaginava, o TRPV1 é expresso em pelo menos três compartimentos celulares, *i.e.* membrana citoplasmática, retículo endoplasmático e nas vesículas citoplasmáticas. (GUO et al., 1999; MORENILLA-PALAO et al., 2004). Enquanto TRPV1 na membrana citoplasmática é responsável pelos efeitos mediados pelo receptor, tais como correntes de entrada e liberação de neurotransmissores, os presentes nas vesículas citoplasmáticas parecem servir como reservas por serem rapidamente translocados para membrana citoplasmática quando estimulados por mediadores celulares (MORENILLA-PALAO et al., 2004). Por outro lado, o papel do receptor expressado pelo retículo endoplasmático ainda não foi totalmente esclarecido. Evidências demonstram que a ativação pela capsaicina induz mobilização de cálcio a partir das reservas intracelulares levando a crer que essa resposta estaria envolvida na regulação da homeostasia de cálcio intracelular ou até mesmo da ativação do estresse oxidativo (KARAI et al., 2004; MARSHALL et al., 2003).

Estas respostas variam dependendo do tecido em que se encontra o receptor, por exemplo, a expressão de TRPV1 em camadas teciduais do urotélio ou células epiteliais gástricas não estão envolvidas com efeitos de dessensibilização, porém induzem um aumento da concentração de cálcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ). As diferenças funcionais na expressão de TRPV1 em células epiteliais e neurônios ainda necessitam maiores estudos, mas parecem

modular respostas celulares (proliferação ou morte celular) e controle do impulso nervoso, respectivamente (NAGY et al., 2004).

O cálcio é importante regulador de uma variedade de processos celulares, muitos dos quais estão desajustados em células de câncer, por exemplo, a proliferação, migração e morte celular (PREVARSKAYA et al., 2011; PHELPS et al., 2010). Em vários tipos de câncer ocorre um aumento na expressão de canais iônicos permeáveis (MONTEITH et al., 2007) que são capazes de elevar a  $[Ca^{2+}]_i$ . Em alguns casos, esta sobrecarga de  $Ca^{2+}$  pode ser associada à clivagem e inativação de transportadores de efluxo localizados nas membranas plasmáticas (BANO et al., 2005; SCHWAB et al., 2002). Como consequência ocorrerá elevação da  $[Ca^{2+}]_i$  e promoção de vias de sinalização para a morte da célula (SCHWAB et al., 2002). Essas observações explicam as respostas apoptóticas induzidas pela capsaicina após a ativação do TRPV1 em linhagens celulares de pulmão (REILLY et al., 2003), glioma (AMANTINI et al., 2007), uretra (CAPRODOSSI et al., 2011) e epiderme (GONZALES et al., 2014; CAPRODOSSI et al., 2011). Como a utilização da capsazepina (antagonista do TRPV1) inibiu a maior parte desses eventos, acredita-se que eles estejam mesmo envolvidos com o receptor. Entretanto, limitação da ativação dos TRPV1 superexpressados em células tumorais é o risco da capsaicina produzir níveis de cálcio citosólicos, os quais não são satisfatórios para induzir morte celular, mas conseguem resultar em proliferação e metástase. (WU et al., 2014; PARKASH; ASOTRA, 2010; STEWART et al., 2014; RODERICK; COOK, 2008). Ainda não se tem valores exatos das concentrações de cálcio intracelular necessários para ocasionar morte ou proliferação celular e, na maioria dos casos linhagens celulares respondem de forma diferente a este estímulo. Porém, acredita-se que ativação constante e direcionada pela capsaicina seja a melhor solução, pois alguns estudos confirmaram que a elevação do  $[Ca^{2+}]_i$  gera respostas dose-dependentes (SÁNCHEZ et al., 2005). Testes *in vitro* com linhagens de células de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP) mostraram que o efeito máximo ocorre com 1  $\mu$ M de capsaicina. Doses menores que 5 nM são capazes de aumentar a  $[Ca^{2+}]_i$  de 22 para 90 nM, enquanto 1  $\mu$ M da droga elevou para 190 nM. Outros dois agonistas TRPV1 foram também capazes de induzir a elevação do cálcio intracelular, sugerindo que o mecanismo de morte celular provavelmente ocorra realmente via TRPV1 (SANZ-SALVADOR et al., 2012).

No entanto, avaliações citotóxicas da capsaicina sobre carcinoma de células escamosas constataram redução da viabilidade independente da ativação do TRPV1 e ocasionadas devido a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (GONZALES et al., 2014). A alteração na

produção de EROs também foi observada de forma dose-dependente ao avaliar células humanas de carcinoma esofágico epidermóide (CE 81T/VGH) (WU et al., 2006) e de câncer de colon (COLO 320DM e LoVo) (YANG et al., 2009), as quais expressaram caspase-3 como marcador apoptótico (WISEMAN; HALLIWELL, 1996). Apesar da caspase-3 ser apontada como sinalizador chave na morte celular induzida pela capsaicina, esta relação também permanece contraditória e refutada por algumas pesquisas (CHOU et al., 2009; TUOYA et al., 2006).

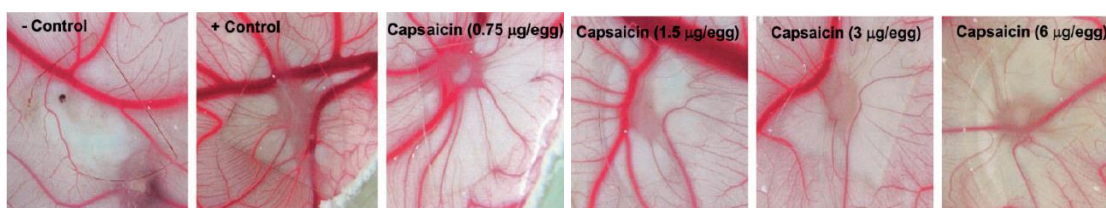
É sabido que a mitocôndria desempenha papel chave na ativação de caspases (proteases específicas de cisteinil aspartato) pois, pelo estímulo de cálcio e citocinas inflamatórias, por exemplo, ela libera citocromo c em respostas apoptóticas (DESAGHER; MARTINOU, 2000; GRUNNET et al., 2009). Evento crítico na morte celular é a transição de permeabilidade mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), devido a inibição da cadeia transportadora de elétrons ocasionando disfunção da organela e consequente apoptose (LOEFFLER; KROEMER, 2000). Alguns indícios são relacionados a apoptose induzida por capsaicina, *i.e.* mudanças nucleares precedidas pela redução na  $\Delta\Psi_m$ , transporte de elétrons não acoplados a partir da síntese de ATP e, aumento na concentração de EROs e do fator de indução apoptótica (*Apoptosis-inducing factor* - AIF) (LEE et al., 2004; WU et al., 2006; HUANG et al., 2009). A morte celular programada é induzida quando AIF é translocado a partir da mitocôndria para o núcleo gerando condensação da cromatina periférica caspase-independente e fragmentação em grande escala do DNA (SUSIN et al., 1999; YE et al., 2002).

Porém, o dano a mitocôndria pode ser uma resposta celular ao estresse oxidativo gerado pelo aumento de EROs e  $[Ca^{2+}]_i$ , o que é reforçado pela expressão de proteínas relacionadas ao estresse, por exemplo, a enzima ativada por inositol 1 (IRE1). A liberação de citocromo c a partir da mitocôndria é seguido por uma sequencial ativação de caspase-9 e -3 em várias células de câncer (SHIN et al., 2003; ITO et al., 2004; JIN et al., 2005; WU et al., 2006; ZHANG et al., 2008). As concentrações necessárias para induzir apoptose em tumores sólidos são variáveis (20 - 300  $\mu$ M) e dependentes do tipo celular avaliado. Porém, a dose necessária para que a capsaicina demonstre atividade *in vivo* ainda não está clara (LEE et al., 2004; YANG et al., 2009; KIM; MOON, 2004; SÁNCHEZ et al., 2006).

Outra propriedade interessante relacionada a capsaicina é a capacidade de interferir negativamente no processo da angiogênese (MIN et al., 2004). Angiogênese, formação de novos vasos a partir de vasos endoteliais pré-existentes, é etapa fundamental em vários processos fisiológicos e patológicos incluindo cicatrização, desenvolvimento embriogênico,

inflamação crônica e, progressão e metástase tumoral. O processo angiogênico é controlado por uma variedade de reguladores positivos e negativos, compostos por fatores de crescimento, citocinas e metabólitos lipídicos. Dentre essas moléculas, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um sinalizador angiogênico solúvel produzido por muitos tumores e células normais sob situações de hipóxia, tem papel chave na regulação positiva da angiogênese (NEUFELD; KESSLER, 2006). A fim de avaliar o potencial antiangiogênico da capsaicina *in vitro*, Min e colaboradores (2004), testaram o crescimento de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) estimuladas por VEGF (10 ng/ml por 48h) e pré-tratadas com doses diferentes de capsaicina. Observou-se inibição da proliferação de HUVEC induzida por VEGF de maneira dose-dependente. Acredita-se que este efeito aconteça devido a ação direta sobre a proliferação do DNA (MIN et al., 2004). Antagonistas competitivos do TRPV1 não afetaram a modulação da angiogênese, indicando que o mecanismo não ocorre por esta via de sinalização. Ao investigar a progressão das fases do ciclo celular, notou-se que a capsaicina afeta a transição de células a partir da fase G<sub>1</sub> para S por inibir ciclina D1. Testes *in vivo* com modelos de angiogênese em membrana corioalantóica (FIGURA 3) e ensaio de matrigel plug em camundongos também confirmaram o potencial antiangiogênico da droga. As concentrações de 0,75; 1,5; 3 e 6 µg/g de capsaicina causaram 25, 38, 55 e 87% de redução na infiltração de vasos sanguíneos na membrana corioalantóica, respectivamente.

FIGURA 3. INIBIÇÃO DA ANGIOGÊNESE INDUZIDA POR TUMOR *IN VIVO*. ENSAIO COM O CONTROLE (-), (+) E COM A CAPSAICINA EM QUATRO DOSES DIFERENTES.



Fonte: Adaptado de MIN et al. (2004).

Até o momento, a relevância dos aspectos estruturais e funcionais do TRPV1 na morte celular e produção de citocinas induzidas por capsaicina ainda é, em parte, desconhecida. Há ocorrências *in vitro* de produção de citocinas inflamatórias e morte celular apoptótica em células epiteliais das vias aéreas estimulada por agonistas do TRPV1 (VERONESI et al., 1999; OORTGIESEN et al., 2000; VERONESI et al., 2003). Observou-se que a expressão aumentada de TRPV1 em células BEAS-2B conferiu aumento na expressão de interleucina-6 (IL-6), IL-8 e morte celular. Entretanto, ao utilizar a capsazepina (antagonista TRPV1) e o



quelador de cálcio EGTA (ácido etileno glicol-bis ( $\beta$ -amino-etil-éter), não houve prevenção da citotoxicidade sobre BEAS-2B, apesar de inibir a expressão das citocinas. Supõe-se que essa redução seja mais devida a deficiência do cálcio intracelular do que ao bloqueio do TRPV1. Porém, as investigações sobre a expressão de citocinas inflamatórias pela capsaicina ainda são carentes na literatura, necessitando maiores estudos, principalmente *in vivo* (REILLY et al., 2003; REILLY et al., 2005).

### 1.1.5 RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS E CÂNCER

O conceito de acúmulo de células indesejadas ocorrer devido a proliferação anormal das mesmas foi alterado. Atualmente se acredita que células também se acumulam quando a velocidade de proliferação é normal, no entanto, a velocidade de morte é lenta (KUNZ et al., 2003). A morte celular ocorre via dois processos principais, necrose e apoptose. Estes processos se diferenciam, além de muitas características, pelas respostas inflamatórias. A formação dos corpos apoptóticos não ativa resposta inflamatória, ao contrário da perda da integridade membranar que ocorre durante a necrose. O processo de apoptose induz exposição de componentes da membrana interna como a fosfatidilserina ficando aparentes nos corpos apoptóticos formados. A presença destes componentes na membrana externa serve como marcador para eliminação celular por fagocitose. Há dois caminhos que levam a apoptose, *i.e.* (I) indução positiva pela ligação de moléculas a receptores na membrana plasmática e (II) indução negativa pela perda de sinal supressor (DENMEADE et al., 1996).

Estes mecanismos muitas vezes são mediados pela ativação de citocinas, por exemplo, o fator *alfa* de necrose tumoral (TNF-*alfa*). Desde que o gene do TNF-*alfa* foi clonado em 1984, pesquisas extensivas têm revelado uma variedade de papéis para esta citocina sob condições fisiológicas tais como imunidade, inflamação, crescimento de tumores e choque séptico. Em nível celular o TNF-*alfa* exerce seus efeitos via seus receptores (TAKASHIBA et al., 1993). Os receptores de TNF-*alfa* (TNFR) podem induzir apoptose, iniciar a proliferação celular, ou ainda, atuar sobre ambas respostas. A família de TNFR contém ainda uma subfamília com um domínio citoplasmático homólogo de 80 aminoácidos. Este domínio é conhecido como “domínio da morte”, pois as proteínas que contêm esta sequência estão envolvidas com a morte celular programada (TARTAGLIA et al., 1993).

Os TNFR podem ser divididos em duas classes codificada por genes distintos, receptor do fator de necrose tumoral do tipo 1 (TNFR1) e do tipo 2 (TNFR2). Estes receptores se

diferenciam tanto na expressão como na resposta gerada. O TNFR1 é expresso em várias células diferentes e sinaliza ambos, a iniciação da apoptose e a ativação do fator de transcrição NF *kappa* B (NFkB). Já o TNFR2, expressado principalmente em células imunológicas, sinaliza a ativação de NFkB mas não a iniciação da apoptose, embora consiga causar a morte celular por mecanismo indireto via TNFR1 (WAJANT et al., 2003). Ou seja, TNFR1 contém o domínio da morte, enquanto TNFR2 não o possui. A citocina TNF-*alfa* tem maior afinidade pelo receptor do tipo 1.

A viabilidade de muitas células é dependente de um constante ou intermitente fornecimento de citocinas ou fatores de crescimento, caso contrário estarão sujeitas a apoptose. A família de proteínas Bcl-2 (célula-B de linfoma 2) são componentes centrais da apoptose resultante da ausência de sinais gerados pela interação de citocinas. A super expressão de alguns membros desta família, *e.g.* Bcl-2 e Bcl-xL suprimem a apoptose quando as citocinas estão ausentes. Entretanto, a maior expressão de outros reguladores celulares como Bad (proteína da morte associada à Bcl-2), Bax (proteína X associada à Bcl-2) e Bik (proteína exterminadora da interação com Bcl-2) substitui a sinalização de receptores de citocina e induzem a apoptose (FARIA; PATROCINIO, 2006).

De forma geral pode-se afirmar que o TNF-*alfa* pode induzir a morte celular por duas vias, uma extrínseca (através da interação com TNFR) e outra que utiliza a apoptose mediada pela mitocôndria (mecanismo intrínseco) (Wajant, 2003). A perda do potencial de membrana mitocondrial juntamente com a expressão do citocromo c e a geração da caspase-3 caracterizam a via intrínseca mediada por TNF-*alfa* (Wang, 2001).

Além da apoptose, TNF-*alfa* consegue também induzir morte celular necrótica (LIN et al., 2004). A necrose é induzida principalmente pelo aumento de EROs, as quais conseguem lesar tanto células normais quanto cancerosas, sendo com isso, importantes no surgimento e progressão de células malignas (WANG; LIN, 2008). Alguns estudos sugerem que o tratamento quimioterápico reduz a concentração do TNF-*alfa* circulante, sendo, portanto, um marcador para o prognóstico e eficiência do tratamento (FERRAJOLI et al., 2002; MICHALAKI et al., 2004; BERBEROGLU et al., 2004).

De acordo com discussões recentes, apesar do TNF-*alfa* conseguir induzir morte celular, processo que consegue ser utilizado como terapia antitumoral (VAN HORSSSEN et al., 2006), ele também pode estimular a proliferação, sobrevivência, migração e angiogênese na maioria das células resistentes a citotoxicidade resultando em promoção do tumor.

Portanto, detectar a expressão desta citocina é essencial para compreender a atividade antitumoral ou antiapoptótica.

Ijiri e colaboradores (2014) observaram que a capsaicina interfere com a transcrição de RNAm do TNF-*alfa* e exerce efeito inibitório na liberação da citocina a partir de macrófagos após a estimulação inflamatória por lipopolissacarídeos (LPS). Outro estudo relacionou mais especificamente esta redução a uma possível ativação do PPAR *gama* (Receptor *Gama* Ativado por Proliferadores de Peroxissoma) em células estimuladas por LPS (PARK et al., 2004). Análises *in vitro* com controle positivo também por LPS confirmaram a atividade inibitória da capsaicina sobre a expressão de TNF- $\alpha$  (VERGARA et al., 2006). No entanto, a ausência de análise com modelos sem estimulação inflamatória não deixa claro se a resposta anti-inflamatória da capsaicina é dependente de estímulo inflamatório prévio, ou até mesmo, se a resposta possa ser contrária sem estímulo positivo.

Outra citocina com complexa sinalização envolvida com a sobrevivência celular é o interferon-*gama* (IFN- $\gamma$ ), originalmente chamado de fator de ativação de macrófago. Esta estimulação de macrófagos induz mecanismo direto antimicrobiano e antitumoral, bem como super regulação de vias de processamento e apresentação de antígenos. IFN- $\gamma$  orquestra a atração de leucócitos e, crescimento, maturação e diferenciação direta de muitas células (YOUNG; HARDY, 1995; BOEHM et al., 1997), além do aumento da atividade das células natural killer (NK) e regulação das funções das células B, estando envolvido nas respostas inatas e adquiridas.

Os interferons podem ser divididos dentro de três grupos, tipo I (IFN- $\alpha$ , - $\omega$ , - $\beta$ ), II (IFN- $\gamma$ ) e III (IFN-*lambda* ou interleucina 28/29) de acordo com a especificidade do receptor e sequência de homologia. O IFN- $\gamma$  é produzido por células CD4+ T *helper* do tipo 1, linfócitos CD8+ citotóxicos, células NK, B e NKT (SCHRODER et al., 2004). Ele possui estrutura e função diferentes dos IFN tipo I e III, tendo seus próprios receptores, IFN $\gamma$ R1 e IFN $\gamma$ R2 (EALICK et al., 1991; PLATANIAS, 2005).

A ativação destes receptores é responsável por acionar uma cascata de fosforilação intracelular que regula a expressão de genes alvo, primariamente relacionados com a defesa do hospedeiro e imunidade, *i.e.* defesa antiviral, antibacteriana, ciclo celular, apoptose, inflamação, imunidade inata e adaptativa (SCHRODER et al., 2004). No entanto, a função mais bem caracterizada do IFN- $\gamma$  é o aumento da regulação do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I para auxiliar a iniciação e a apresentação de antígenos das células apresentadoras de antígenos profissionais (SELIGER et al., 2008). O

IFN- $\gamma$  está intimamente envolvido em todos os aspectos imunológicos mediados por Th1 (células T do tipo 1) por regular a diferenciação, ativação e homeostase de células T. Ele inibe o desenvolvimento de células Th2, mas promove o aumento de células T regulatórias (Treg) (AGNELLO et al., 2003), além de ativar macrófagos e induzir a produção de quimiocinas inflamatórias (HU et al., 2008).

A produção de IFN- $\gamma$  é estimulada pela secreção de algumas citocinas produzidas por células dendríticas, principalmente interleucina-12 (IL-12), IL-2 e IL-18. Por outro lado, reguladores negativos incluem IL-4, IL-10 (SCHINDLER et al., 2001; FUKAO et al., 2001; HOCHREIN et al., 2001). As funções imunomoduladoras do IFN- $\gamma$ , tornam esta citocina útil para várias aplicações clínicas, incluindo doença granulomatosa crônica, infecções fúngicas, doenças autoimunes e câncer (MILLER et al., 2009). Alguns tumores resistentes à apoptose não expressam IFN $\gamma$ R1, reforçando a ideia de que a ativação deste receptor possui função de detecção e eliminação do tumor (DIGHE et al., 1994; KAPLAN et al., 1998). Essa vigilância do tumor aparenta envolver reconhecimento e eliminação do tumor por linfócitos citotóxicos T (*cytotoxic T lymphocytes*, CTLs) recrutados para a massa tumoral via sinalização de quimiocinas induzidas por IFN- $\gamma$  (KUNZ et al., 1999; MUKAI et al., 1999; CHIN et al., 1996). Estas respostas foram confirmadas ao observar que IFN-*gama* recombinante está envolvido em respostas anti-proliferativas (CHIN et al., 1996; HOBEIKA et al., 1999; PLATANIAS et al., 1999), anti-angiogênicas (BEATTY; PATERSON, 2001; COUGHLIN et al., 1998; RUEGG et al., 1998) e pró-apoptóticas (CHAWLA-SARKAR et al., 2003) de células de câncer. O conjunto destes mecanismos antitumorais é conhecido como *cancer immunoediting*, processo dinâmico que pode ser dividido em três fases: eliminação, equilíbrio e escape (DUNN et al., 2006). Entretanto, apesar da utilização clínica do IFN, ainda há indícios que ele possa apresentar propriedades pró-tumorigênica (MELLOR; MUNN, 2008; BRODY et al., 2009; KATZ et al., 2008; PRENDERGAST, 2008; IRMLER et al., 2007; MANOURY-SCHWARTZ et al., 1997; HERLYN et al., 1985; TSUJISAKI et al., 1987), o que amplia a necessidade de maiores estudos para definir qual a característica do microambiente tumoral que determinará se a citocina será pró- ou anti-cancerígena.

Takano e colaboradores (2007) avaliaram a expressão de citocinas (IL-2, IL-4 e IL-5 e IFN- $\gamma$ ) a partir de avaliação *in vitro* e *ex vivo* de células intestinais de camundongos após a administração oral de extrato de *Capsicum annum* L. e capsaicina isolada. Eles observaram aumento na expressão de IL-2, -4 e IFN . Estes resultados contrariam outros que indicaram

que a capsaicina consegue suprimir a expressão destas citocinas de maneira dose dependente. (GERTSCH et al., 2002; FISCHER et al., 2001; SANCHO et al., 2002).

Entretanto, a injeção intraplantar de capsaicina em ratos produziu rápido aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 (SAADE et al., 2002). Segundo Basu e Srivastava (2005), esta propriedade pró-inflamatória *in vivo* via transdérmica estimula a maturação e migração de células dendríticas na pele por mecanismo independente do TRPV-1 (BASU; SRIVASTAVA, 2005). Outra observação importante sobre a relação da capsaicina com a resposta influenciada pelo IFN- $\gamma$  é que ela foi capaz de reduzir a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC-II) (MAHMOUD et al., 2010), tornando-se um potencial fármaco com ação imunossupressora, porém podendo dificultar o reconhecimento do tumor pelo sistema imunológico (THIBODEAU et al., 2012).

Uma proteína de aproximadamente 15.000 Daltons com dois resíduos farmacofóricos, cisteínas 58 e 105, caracteriza estruturalmente uma terceira interleucina com relevantes propriedades, a IL-2 (WANG et al., 1984). Os efeitos clínicos da IL-2 ocorrem por meio da interação com o receptor de interleucina-2 (IL-2R), o qual induz de forma eficiente a ativação de células T. Esta interleucina consegue estimular a produção de IL-1 *alfa* e IL-1 *beta* por células mononucleares em sangue periférico humano (NUMEROF et al., 1988), assim como a estimulação de TNF- $\alpha$ , - $\beta$  (NEDWIN et al., 1985), IFN- $\gamma$  e linfotoxinas os quais contribuem para os efeitos colaterais da terapia sistêmica com IL-2. Outra propriedade importante apresentada é o aumento da atividade citolítica de linfócitos T e células NK, reforçando as propriedades antitumorais desta citocina (ANTONY; DUDEK, 2010). Altas doses de IL-2 têm confirmado o potencial no tratamento de vários tipos de cânceres, portanto, substâncias que estimulem a sua expressão podem auxiliar no tratamento de tumores (ROSENBERG et al., 1994; MCCABE et al., 1991; ROSENBERG et al., 1989).

Como anteriormente citado, extratos de pimenta vermelha assim como a capsaicina livre conseguiram aumentar a expressão de algumas citocinas, por exemplo, a expressão de IL-2 em estudos *in vitro* e *ex-vitro* (TAKANO et al., 2007). Entretanto, os resultados *in vivo* com capsaicina ainda permanecem inconclusivos sobre a expressão de IL-2 em animais saudáveis tratados com doses variadas de capsaicina via parenteral.

Outra citocina que merece atenção especial na relação com a capsaicina é a interleucina 4 (IL-4). Ela é uma citocina pleitrópica produzida por linfócitos T que age em várias células, tais como, linfócitos T e B, monócitos, fibroblastos, células endoteliais e

macrófagos. Alguns estudos recentes demonstram que IL-4 tem papel chave não somente na diferenciação de linfócito T naive em Th-2, mas também como inibidor do crescimento tumoral (NAGAI; TOI, 2000). Surpreendentemente, o estudo de Kornmann e colaboradores obteve resultados opostos, ou seja, conclui-se que a presença de IL-4 no meio de cultura induziu o crescimento de células tumorais de pâncreas, podendo ser um importante fator do crescimento e metástase tumoral (PROKOPCHUK et al., 2005).

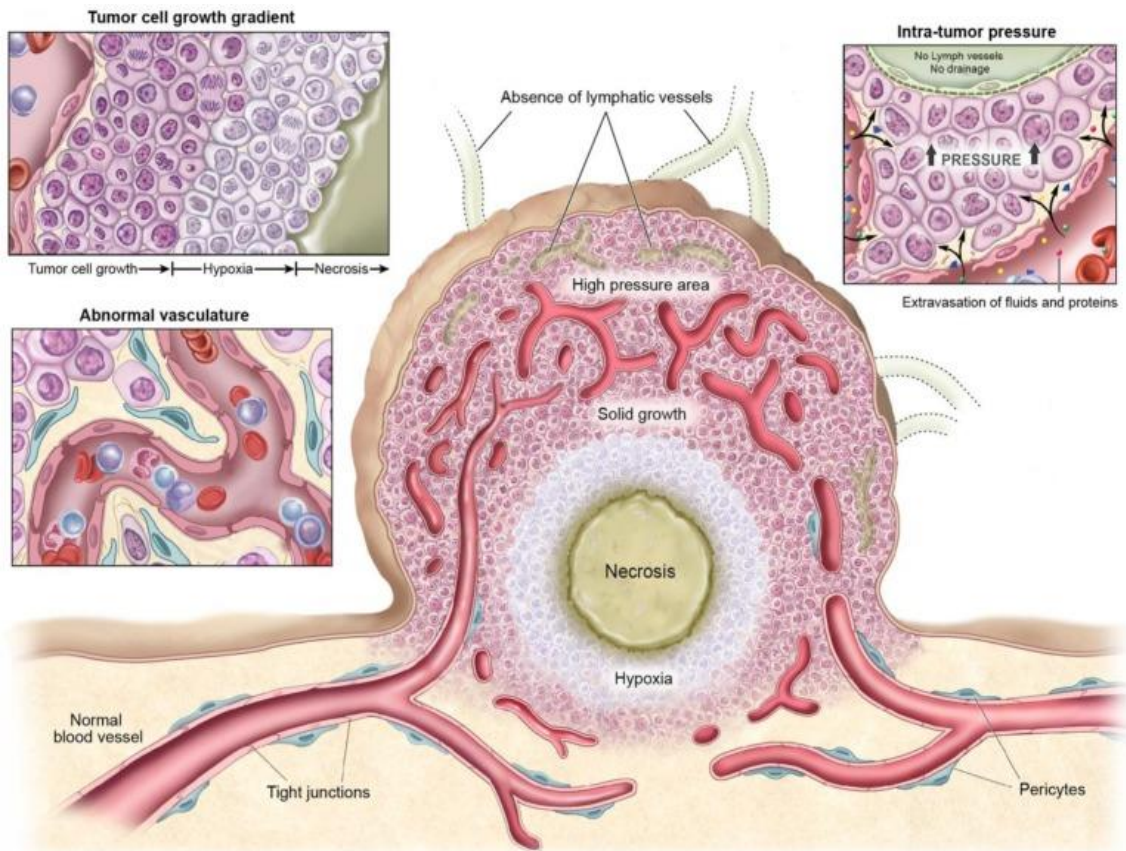
A presença dos receptores TRPV1 na superfície de macrófagos parece contribuir para a resposta inflamatória pelo aumento na produção de IL-4. Além disso, *in vitro*, a capsaicina promoveu aumento de células dendríticas e, consequentemente maior expressão de IL-4 (STÄNDER et al., 2004). Apesar dos indícios da relação positiva entre a capsaicina e IL-4, alguns estudos *in vivo* têm obtido resultados de modulação negativa (GERTSCH et al., 2002; FISCHER et al., 2001; SANCHO et al., 2002). Portanto, novas investigações tornam-se necessárias para aferir a real relação entre a capsaicina e a IL-4 e, se a dose teria influência na resposta.

#### 1.1.6 CARACTERÍSTICA DAS CÉLULAS TUMORAIS, UM ALVO PARA NANOFÁRMACOS

Compreender e desvendar as características celulares de tumores malignos permite identificar possíveis alvos terapêuticos, planejar tratamentos mais seletivos e menos tóxicos. A complexa maquinária biológica ativada no microambiente do tumor provoca várias alterações quando comparada a um ambiente de tecidos normais. Uma etapa fundamental no desenvolvimento e até mesmo metástase tumoral é a estimulação da angiogênese sob situações de hipóxia. Entretanto, este processo cria uma rede de vascularização anormal que é caracterizada por canais dilatados, tortuosos e com várias ramificações (PAPETTI; HERMAN, 2002; FUKUMURA et al., 2010; ZIYAD; IRUELA-ARISPE, 2011).

Como consequências dessas anormalidades vasculares observa-se a heterogeneidade do fluxo sanguíneo no tumor, a superfície endotelial fenestrada com espaços entre as células, pouca ou nenhuma função de barreira endotelial, ausência de vasos linfáticos e elevada pressão no microambiente do tumor (FIGURA 4) (YUAN et al., 1995; INAI et al., 2004; MORIKAWA et al., 2002).

FIGURA 4. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS INERENTES DO MICROAMBIENTE DE UM TUMOR SÓLIDO.



Fonte: Adaptado de Kobayashi et al. (2014).

Uma das técnicas que mais tem apresentado vantagens no combate de células tumorais são os nanofármacos. Eles são particularmente relevantes contra o câncer porque o tumor frequentemente possui vasculatura mais permeável quando comparada com vasos em tecidos saudáveis (NAGY et al., 2009). Quando administrados por via endovenosa, os agentes nanoparticulados tendem a apresentar maior tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), pois eles não são pequenos suficientes para serem excretados pelos rins ou grande suficiente para serem rapidamente reconhecidos e aprisionados pelo sistema reticuloendotelial (KOBAYASHI; BRECHBIEL, 2005).

Devido à característica tumoral de maior permeabilidade na vasculatura e capacidade de retenção interna observada pela redução da drenagem linfática, os polímeros nanométricos tendem a se acumular nas células tumorais. Este processo é conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (*enhanced permeability and retention- EPR*). O acúmulo dos nanocarreadores dentro das células tumorais por processo passivo permite uma

maior seletividade dos efeitos citotóxicos dos fármacos, maior tempo de ação e menor flutuação plasmática da droga (WAITEA; ROTH, 2012; KOBAYASHI et al., 2014).

Por representar um expressivo avanço no tratamento do câncer, sistemas de nanocarreamento de fármacos são considerados o futuro dos novos antitumorais (BHARALI et al., 2009). Exemplos da nanotecnologia relacionados com câncer incluem medicamentos injetáveis, *e.g.* nanovetores, tais como lipossomos para terapia do câncer de mama (PARK, 2002; FERRARI, 2005), como também formulações por ambas as vias, oral ou injetável, como por exemplo, o fármaco paclitaxol associado à albumina como carreador (Abraxane®). Estas formulações têm potencial para direcionar alta concentração dos fármacos para células de câncer e geram menor toxicidade quando comparadas à administração da droga livre. A farmacocinética também sofre considerável melhora devido à proteção dos princípios ativos contra degradação enzimática, física e ambiental (*i.e.* temperatura, umidade, raios UV e pH) (NETTI et al., 1995; KLIBANOV et al., 1991).

A terapia com nanopartículas de albumina desenvolvidas com paclitaxol não necessita de qualquer pré tratamento com fármacos anti-inflamatórios esteroidais, os quais são necessários com medicamentos convencionais. Além disso, a albumina aumenta o transporte das nanopartículas através do endotélio vascular, elevando a concentração local de paclitaxol em até 50% (ALLEN, 2002; PARK, 2002). Apesar deste e de vários outros relatos de sucesso (TABELA 3) com novos medicamentos sendo patenteados e lançados no mercado, ainda são poucos os medicamentos que exploraram esta nova e promissora técnica, o que deve mudar nos próximos anos devido a padronização de síntese dos polímeros para vários fármacos.

TABELA 3. NOVAS NANOFORMULAÇÕES APROVADAS RECENTEMENTE PELA FDA.

PRODUTO	EMPRESA	FÁRMACO	FORMULAÇÃO
<b>Doxil®</b>	Sequus Pharm.	Doxorubicina	PEG
<b>Daunoxome®</b>	NeXstar Pharm.	Daunorubicina	Lipossoma
<b>Emend®</b>	Merck/Elan	MK 869	Lipossoma
<b>Abraxane®</b>	Abraxis Biosc.	Paclitaxol	Albumina
<b>Myocet®</b>	Zenus Pharma	Doxorubicina	Lipossoma
<b>Oncaspar®</b>	Enzon	L-asparaginase	Polímeros conjugados de proteínas

O controle do diâmetro da nanopartícula e da carga superficial do polímero é fundamental para otimizar a farmacocinética, reduzir a opsonização e tornar o carreador solúvel no plasma. Segundo Kobayashi e colaboradores (2014) ao se planejar um



nanofármaco alguns parâmetros devem ter especial atenção, como diâmetro ideal ( $< 300$  nm) e buscar sempre a carga do polímero quanto mais próximo da neutra possível.

Para investigar as características morfológicas, físico-químicas e de liberação dos fármacos a partir de nanoformulações, várias técnicas são empregadas, por exemplo, microscopia, difração de raios-X, cromatografia líquida de alta eficiência, *light scattering*, dentre outros.

### 1.1.7 NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA

A albumina é uma proteína carreadora de fármacos com alta eficiência, pois altera perfis farmacocinéticos e eleva o  $t_{1/2}$  dos fármacos, os quais podem atingir até 19 dias ( $t_{1/2}$  da albumina sérica humana, HSA). As albuminas séricas humana e bovina (BSA) demonstram várias propriedades interessantes:

1. Agem como agentes solubilizantes para fármacos com elevado valor de coeficiente de partição ( $\log P$ );
2. Ligam-se e transportam fármacos de classes terapêuticas diferentes;
3. São carreadores para cobre (II), níquel (II), cálcio (II) e zinco (II) no sangue;
4. Ao se degradarem, os aminoácidos fornecem nutrição para os tecidos periféricos;

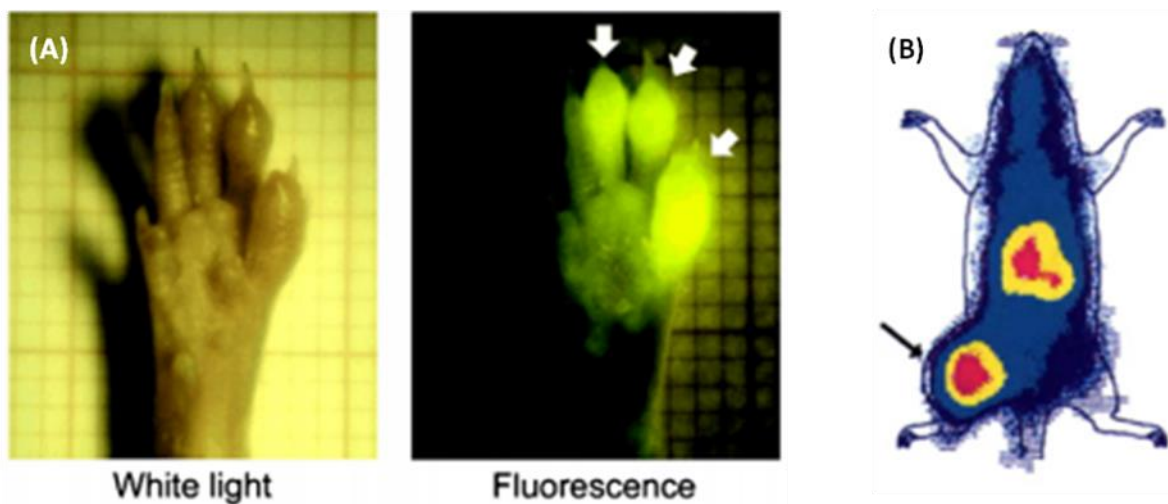
A albumina é uma proteína com característica ácida, hidrossolúvel e extremamente robusta (estável em pH 4 – 9, podendo ser aquecida até 60 °C por 10 horas sem sofrer desnaturação). A robustez torna mais seguro o emprego desta proteína plasmática como carreadora de fármacos (ALLEONI, 2006). Estas propriedades, bem como absorção preferencial em ambos tecidos tumorais e inflamados, sua pronta disponibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade a credencia como um candidato ideal para transporte e direcionamento da droga.

O mecanismo de opsonização parece ser influenciado pela curvatura da superfície do sistema transportador, em que os transportadores menores induzem a uma adsorção reduzida de proteínas e opsoninas, minimizando o efeito de células fagocíticas (HARASHIMA et al., 1994). Observou-se que a extensão da opsonização diminuiu com uma redução no tamanho da partícula de 800 para 200 nm, e nenhuma melhoria da captação fagocítica devido à opsonização foi observada nos tamanhos de partículas inferiores a 200 nm. Para sistemas coloidais muito pequenos, com tamanho abaixo de 100 nm, foi descrito que, após injeção intravenosa estes carreadores foram capazes de atravessar a fenestração no endotélio hepática

sinusoidal, levando a uma acumulação hepática em vez de uma longa circulação intravascular. Mesmo os sistemas, tais como lipossomos, com tamanho médio de aproximadamente 400 nm e estrutura altamente deformável, foram capazes de atravessar a fenestração endotelial, enquanto que os sistemas rígidos e de mesmo diâmetro não foram capazes (ROMERO et al., 1999). Uma vez que as nanopartículas são caracterizadas por uma matriz de partícula sólida, de acordo com as conclusões descritas, um sistema de circulação de tempo longo só pode ser conseguido com diâmetro aproximado de 200 nm. Como consequência, um aspecto importante na preparação de um sistema coloidal transportador de fármacos é estabelecer as condições de preparação, que controlam o tamanho de partícula resultante e que conduzam à partículas com uma distribuição de tamanho estreita.

A albumina possui característica de direcionamento passivo e acúmulo em tumores sólidos (KRATZ; BEYER, 1998) e regiões com características tumorais (WUNDER et al., 2003), sendo, portanto, útil para tratamento e diagnóstico (FIGURA 5).

FIGURA 5. (A) NANOPARTÍCULA DE ALBUMINA MARCADA COM AMINOFLUORESCENCE (AFLC), DESTACANDO A REGIÃO ACOMETIDA POR ARTRITE. (B) ALBUMINA COMPLEXADA COM EVANS BLUE FLUORESCÊNCIA DESTACANDO A DISTRIBUIÇÃO PARA O TUMOR DE WALKER 256 INOCULADO NA PATA ESQUERDA DO RATO AO LONGO DE 72H.



Fonte: (A) Adaptado de Wunder, et al. (2003). (B) Adaptado de Kratz, et al. (1998).

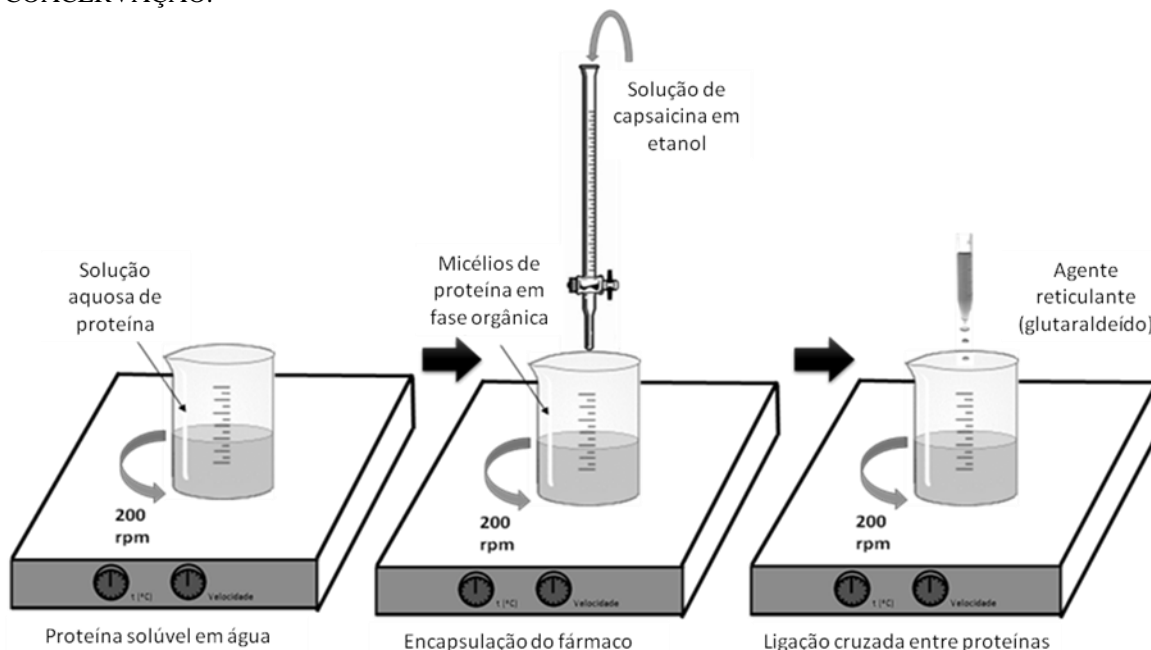
Entre os sistemas coloidais transportadores de fármacos disponíveis que se capacitam a cobrir a faixa de diâmetro descrito anteriormente, as nanopartículas baseadas em proteínas desempenham papel importante. Basicamente três métodos diferentes para a sua preparação foram descritos, com base na formação de emulsão, dessolvatação, ou coacervação. Com respeito às técnicas de emulsão aplicáveis à albumina, um estudo completo e sistemático

sobre a influência da concentração de proteína, tempo e poder de emulsificação, taxa de agitação, temperatura de estabilização e o tipo da fase não aquosa foi realizada por Gallo e colaboradores (1984).

A desvantagem dos métodos de emulsão para a preparação de partículas é a necessidade de aplicação de solventes orgânicos, para a remoção de ambos os resíduos oleosos do processo de preparação e dos surfactantes necessários para a estabilização da emulsão. Portanto, como método alternativo para a preparação de nanopartículas, um processo de dessolvatação derivado da coacervação foi desenvolvido. Em 1993, Lin e colaboradores descreveram a preparação de nanopartículas HSA de diâmetro em torno de 100nm, utilizando método livre de surfactantes. Esta técnica foi otimizada em 2003, quando diversas variações nas etapas de síntese demonstraram a importância da padronização analítica de cada fase (LANGER et al., 2003).

A dessolvatação seguida por coacervação (FIGURA 6) se caracteriza como método de fácil manuseio, poucas etapas e de alto controle do tamanho e homogeneidade das nanopartículas formadas. Este método consiste em solubilizar o polímero (albumina) em água destilada e manter sob constante agitação. Em seguida adiciona-se ao meio aquoso a droga dissolvida em solvente capaz de realizar a dessolvatação, por exemplo, o etanol. O agente reticulante glutaraldeído tem papel fundamental em estabilizar o complexo formado entre as macromoléculas de albumina. Em seguida, a solução, agora com o polímero, droga e o agente reticulante, são deixados sob agitação constante durante um período pré-determinado, normalmente 24 horas. Ao final deste período, devem-se avaliar as propriedades dos aglomerados obtidos, pois são sensíveis à variações no processo da síntese, isto é, velocidade de adição das soluções, concentração dos solutos e reagentes, além de temperatura e pH do meio. Este processo pode ser empregado para produção de nanopartículas com fármacos encapsulados assim como para nanopartículas de albumina vazias, utilizadas para avaliação do controle negativo.

FIGURA 6. OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS ATRAVÉS DO MÉTODO DE DESSOLVATAÇÃO-COACERVAÇÃO.



Apesar da grande importância da albumina como polímero carreador de fármacos, não há ainda nenhuma formulação associada com capsaicina. A maior parte dos estudos desenvolveu nanopartículas para administração transdérmica com partículas híbridas lipídeo-polímero (CONTRI et al., 2011; PINAKI et al., 2013), nanocarreadores lipídicos (AGRAWAL et al., 2015; RAZA et al., 2014) e hidrogéis de quitosana com solução alcoólica de capsaicina (CONTRI et al., 2014). Nenhum destes nanocarreadores obteve diâmetro da partícula maior do que 160 nm e a menor porcentagem de eficiência de encapsulação (%EE) foi de 87,4%. Apesar dos promissores resultados de caracterização físico-química, estas formulações são de uso exclusivo tópico, sem a possibilidade de administração sistêmica.

A fim de resolver este problema farmacocinético da capsaicina, algumas formulações também foram planejadas para uso oral, como por exemplo, os polímeros de policaprolactona, poli(lactídeo-co-glicolídeo) e ácido poli(lático), porém, estes apesar de apresentarem bons valores médios de diâmetro (160 nm), demonstraram baixíssima %EE (22%) (KIM et al., 2011; JIANG et al., 2015). Resultados similares foram observados no estudo de Peng e colaboradores (2015), onde o polímero metoxi poli(etilenoglicol)-poli( $\epsilon$ -caprolactona) (MPEG-PCL), caracteriza-se com diâmetro de  $82,54 \pm 0,51$  nm, mas possui %EE baixíssima, apenas 14%. Por outro lado, as nanopartículas lipossomais constituídas por fosfolipídeos, colesterol, colato de sódio e miristato isopropílico obtiveram diâmetro de  $52,2 \pm 1,3$  nm e %EE de aproximadamente 90% (ZHU et al., 2015). Entretanto, partículas lipossômicas são

reconhecidas no plasma por proteínas plasmáticas, tais como opsoninas (*e.g.* imunoglobulinas e fibronectina), HDL e LDL. As opsoninas conseguem reconhecer e eliminar os lipossomos, enquanto que, HDL e LDL interagem com lipossomos, desestabilizando-os. A interação com estas lipoproteínas causa transferência de lipídeos e rearranjo na superfície dos lipossomos. Isto frequentemente induz depleção de lipídeos, lise do lipossoma e rápida liberação da substância carregada (GIUSEPPINA et al., 2015). Além disso, o diâmetro reduzido pode levar a um acúmulo hepático do fármaco, prejudicando a distribuição até os sítio de ação.

Avaliações *in vitro* das propriedades anti-amilóide (ANAND et al., 2016) e de mucoadesão estomacal (TACHAPRUTINUNA et al., 2013) também foram feitas para polímeros de prata e com 4 nanocarreadores diferentes (N-succinilquitosana, alginato, etilcelulose e uma mistura de metilcelulose e etilcelulose), respectivamente. Entretanto, estas formulações não foram planejadas para direcionamento passivo à tumores.

Deste modo, criar um nanofármaco que utilize a albumina bovina (menor custo que a homóloga humana) para carrear a capsaicina com o objetivo de melhorar a farmacocinética e reduzir os danos sobre células saudáveis seria uma ótima opção de desenvolvimento tecnológico para um futuro medicamento.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

1. Desenvolver nanopartículas de albumina com capsaicina
2. Avaliar o potencial farmacológico dessas nanopartículas

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 – Desenvolvimento e validação de um método por CLAE para identificação e quantificação da capsaicina
- 2 - Adaptar técnicas de síntese para obter uma nova formulação com nanopartículas de albumina com capsaicina
- 2 - Caracterizar por métodos físico-químicos e microscópicos a formulação desenvolvida
- 3 - Avaliar a estabilidade das nanopartículas e liberação *in vitro* da capsaicina
- 4 - Mensurar a atividade antioxidante da capsaicina livre e nanoencapsulada
- 5 - Investigar *in vivo* a expressão de citocinas induzidas pelas capsaicinas livre e nanoencapsulada
- 6 – Avaliar a toxicidade da capsaicina livre e nanoencapsulada em modelos *in vivo* com animais sadios
- 7 – Avaliar *in vitro* o potencial citotóxico da formulação sobre células tumorais
- 8 - Gerar um produto inovador com potencial terapêutico e de comercialização

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

A fim de atingir os objetivos propostos para o estudo, as etapas metodológicas foram divididas em seis partes distintas, porém dependentes entre si:

3.1 Equipamentos, materiais e reagentes

3.2 Desenvolvimento e validação do método analítico;

3.3 Desenvolvimento e caracterização das nanopartículas;

3.4 Experimentos *in vitro* para determinação da atividade antioxidante e cinética de liberação da capsaicina;

3.5 Testes *in vivo* para avaliar a toxicidade e expressão de citocinas;

3.6 Testes *in vitro* para avaliar a atividade antitumoral.

A aquisição dos reagentes, custeio de viagens, materiais e animais experimentais foram realizados por financiamento do próprio aluno com auxílio da bolsa de estudo de doutorado fornecida pelo órgão de fomento Capes ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde.

#### 3.1 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS, ANIMAIS E CÉLULAS

Vários equipamentos utilizados no decorrer desta pesquisa foram gentilmente cedidos ou disponibilizados por laboratórios, departamentos e instituições diferentes. Portanto, junto a identificação de cada equipamento estará também a descrição do laboratório, o qual disponibilizou o equipamento.

##### EQUIPAMENTOS:

- Vortex QL-901 - Vertex<sup>®</sup> (Laboratório de Nanotecnologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)
- Light Scattering Particle Size Analyser 90 PLUS - Brookhaven<sup>®</sup> (Laboratório de Nanotecnologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)
- Cromatografia líquida de alta eficiência Waters e2695 - Alliance<sup>®</sup> (Laboratório de Nanotecnologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)
- Incubadora com agitação orbital - Quimis<sup>®</sup> (Laboratório de Nanotecnologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)

- Lavadora ultra-sônica - Unique® (Laboratório de Nanotecnologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)
- Aparelho automatizado Flexor E da Vital Scientific® (Laboratório Mestre de análises clínicas, Guarapuava, PR)
- Equipamento para análise do potencial zeta – ZetaSizer ZS, Malvern (Departamento de Química - DEQ, UNICENTRO)
- pHmetro pH/mV/TDS/Temp.meter 86505 - AZ® (Laboratório de Nanotecnologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)
- Balança analítica - BEL engineering® (Laboratório de Nanotecnologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)
- Centrífuga - HERMLE® (Laboratório de Nanotecnologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)
- Liofilizador LD1500 - TERRONI Equipamentos Científicos® (Laboratório de Nanotecnologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)
- Bomba a vácuo TE-058 - TECNAL® (Laboratório de Nanotecnologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)
- Millipore - Milli-Q® (Laboratório de Nanotecnologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)
- Pipeta Confort calibre 100 - 1000µl - Discovery® (Laboratório de Nanotecnologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)
- Pipeta Confort calibre 10 - 100µl - Discovery® (Laboratório de Nanotecnologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)
- Pipeta Confort calibre 2 - 20µl - Discovery® (Laboratório de Nanotecnologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)
- Micropipeta Confort calibre 1 - 10µl - Discovery® (Laboratório de Nanotecnologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)
- Calorimetria exploratória diferencial SDT Q600 TA Instruments® (Departamento de Física - DEFIS, UNICENTRO)
- Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM 6360-LV (Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná)
- Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JEM 1200EX-II acoplado à câmera de alta resolução CCD Gatan Orius SC1000B (Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná)



- Coluna fase reversa C18 (25cm X 4mm) de tamanho de partícula 5 µm – Xterra Waters® (Laboratório de Nanotecnologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)
- Aparelho de Infravermelho Nicolet IR200 FT-IR Thermo Scientific, EUA (Departamento de Química - DEQ, UNICENTRO)
- Difratorômetro de raios X Bruker – Mod. D2 PHASER (Departamento de Química - DEQ, UNICENTRO)
- Aparelho hematológico automatizado Abx Micro 60, Horiba - ABX SAS® (Laboratório Mestre de análises clínicas, Guarapuava, PR)
- Estufa Microprocessada de CO<sup>2</sup> Quimis® (Laboratório de Nanotecnologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)
- Citômetro de fluxo C6 CSampler, BD Accuri® (Laboratório de Biologia Molecular e Virologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)
- Espectrofotômetro ultravioleta FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices® (Laboratório de Nanotecnologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)
- Capela de fluxo Bio Seg 09, Grupo Veco® (Laboratório de Nanotecnologia - Departamento de Farmácia/ UNICENTRO)

#### MATERIAIS E REAGENTES:

- Acetonitrila grau CLAE CAS n° 75-05-8 - EMD Millipore Corporation®
- Metanol grau CLAE CAS n° 67-56-1, Tedia®
- Álcool etílico absoluto 99,5% P.A. - Biotec Reagentes Analíticos®
- Álcool etílico 70%
- Membranas filtrantes (acetato de celulose 0,22 µm e PTFE 0,45 µm) Millipore®
- Kit bioquímico, Labtest Diagnóstica SA®
- Kit panótico rápido, Laborclin®
- Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio, Sigma-Aldrich®
- Penicilina ≥98.0%, Sigma-Aldrich®
- Estreptomicina BioReagent, *suitable for cell culture*, Sigma-Aldrich®
- Capsaicina >90% Galena Indústria e Comércio LTDA.
- Capsaicina P.A. ≥99.0% 12084, Sigma-Aldrich®
- Glutaraldeído 50%, SP Labor Equipamentos de Laboratório®
- Ketamina (Dopalen injetável), ampola com 10 mL, Ceva Brasil®
- Xilazina (Anazedan injetável), ampola com 10 mL, Ceva Brasil®

- Saco de ração 20 Kg, Nuvilab®
- Seringa 5mL sem agulha, BD Plastipak®
- Agulhas de 0,55 mm
- Meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove's, Sigma-Aldrich®
- Agulhas de 0,7 mm
- Azul de Trypan 0,4%, Sigma-Aldrich®
- Soro fetal bovino 10%, Gibco®
- kit BD® CBA Mouse Th1/Th2
- Saco de maravalha de 30 Kg
- Tubos BD Vacutainer® SST® II Advance® de 5 ml
- Tubos BD Vacutainer® EDTAK2 de 2 ml

#### ANIMAIS E LINHAGEM CELULAR:

- Ratos wistar machos com 8 semanas de vida e peso de 280+-25 g (Biotério da Pontifícia Universidade Católica/Paraná)
- Células de melanoma murino, B16-F10 (ATCC)

### 3.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

O desenvolvimento da técnica analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizado com o objetivo de padronizar um método de quantificação para a capsaicina. Este método determinou parâmetros fundamentais na característica das nanopartículas como eficiência de encapsulação (%EE) e a cinética de liberação do fármaco *in vitro*. Para tanto, foi necessário validar a robustez, linearidade, exatidão, especificidade, precisão, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Estes parâmetros foram analisados segundo as normas da *International Conference on Harmonization* (ICH) (2005) e da resolução R.E. 899, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

Várias condições cromatográficas foram testadas a fim de investigar os melhores parâmetros para a quantificação da capsaicina em CLAE. Para determinar a fase móvel investigou-se a qualidade do pico (intensidade e uniformidade) da solução de 50 µg/ml de capsaicina com as fases água:acetonitrila (GUO et al., 2015), metanol:acetonitrila (COLLINS et al., 1995) e metanol:água (WAITE; ANDREW), alterando a concentração dos solventes em 5% para cada leitura. Por exemplo, as proporções metanol:água, metanol:acetonitrila e

água:acetonitrila foram avaliadas ( $n = 3$ ) em 19 concentrações diferentes cada fase móvel mencionada, i.e., 5:95; 10:90; 15:85; 20:80; 25:75; 30:70; 35:65; 40:60; 45:55; 50:50; 55:45; 60:40; 65:35; 70:30; 75:25; 80:20; 85:15; 90:10; 95:5. A solução com capsaicina foi sempre preparada nas mesmas proporções da fase móvel avaliada, ou seja, se a fase móvel utilizada na leitura fosse 25:75 (água:acetonitrila), a capsaicina seria dissolvida em meio com 25% de água e 75% de acetonitrila, por exemplo. Outro parâmetro analisado foi o volume de injeção da amostra no CLAE, o qual quatro volumes diferentes foram testados, 10; 25; 50 e 100  $\mu\text{L}$  de amostra por injeção. As temperaturas da coluna e amostra em 25°C, o tipo da coluna (coluna fase reversa C18, 25cm X 4mm), tempo de corrida de 8 minutos e absorbância no detector ultravioleta acoplado ao CLAE em 280 nm foram mantidos.

Preparou-se soluções-mãe de capsaicina 10 mg/mL (Galena®) diluídas em etanol. Estas soluções foram fracionadas para 50  $\mu\text{g/mL}$  nas mesmas proporções dos solventes utilizados como fase móvel em cada análise e procedeu-se a leitura. O volume de solução-mãe restante foi acondicionado em frascos vials a 4 °C em geladeira e ao abrigo da luz.

Após definir a melhor fase móvel para identificar o fármaco proceder-se-ia a curva de calibração com a amostra de capsaicina da empresa Galena®. Porém, como este produto não especificava a pureza de capsaicina dentro do lote adquirido tornou-se necessário realizar com a fase móvel, pré selecionada entre as testadas, uma curva de calibração com oito concentrações (200; 100; 50; 25; 10; 5; 2,5 e 0,75  $\mu\text{g/mL}$ ) com padrões de capsaicina de alta pureza  $\geq 99.0\%$  para determinar a concentração do lote adquirido da empresa Galena.

Após obter o conhecimento do grau de pureza da capsaicina (Galena®), procedeu-se para a realização da curva de calibração com a amostra. Para isto utilizou-se a solução padrão (solução-mãe) que estava armazenada na geladeira, por tempo não maior do que 10 dias, a qual foi diluída na proporção dos solventes selecionados como fase móvel, obtendo oito concentrações diferentes (200; 100; 50; 25; 10; 5; 2,5 e 0,75  $\mu\text{g/mL}$ ). Antes da injeção, os padrões e as amostras foram filtrados através de um filtro de tamanho de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore®) para evitar danos à coluna cromatográfica.

### 3.2.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Os parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, robustez, LQ e LD foram determinados pela análise da curva analítica da capsaicina (Galena®), amostra que será utilizada até o fim do experimento. A linearidade foi determinada com base no cálculo de

regressão linear empregando mínimos quadrados, a partir da construção de uma curva analítica (área do pico *versus* concentração da amostra) utilizando-se seis soluções-padrão ( $n = 3$ ) de capsaicina (200, 100, 50, 25, 10 e 5  $\mu\text{g/mL}$ ) em uma mistura de metanol:água (85:15, v/v), fase móvel selecionada entre as testadas. Julga-se satisfatória a linearidade do gráfico quando o coeficiente de correlação da reta obtida não é estatisticamente diferente da unidade 9, sendo a correlação fortíssima quando o R é maior do que 0,91 e menor que 0,99. Segundo a ANVISA métodos analíticos bioanalíticos devem apresentar valores de 0,99 e 0,98, respectivamente (BRASIL, 2003).

A seletividade foi avaliada por comparação dos cromatogramas representativos de amostras contendo possíveis substâncias interferentes (excipientes utilizados na composição de nanopartículas, *i.e.* etanol, glutaraldeído e albumina) e amostras contendo somente capsaicina. Este estudo é fundamental para avaliar possíveis alterações nos picos do cronatograma da capsaicina, os quais podem modificar o tempo de retenção e intensidade dos resultados.

A precisão foi analisada por dois métodos, intra-corrida (repetibilidade) e inter-corridas (precisão intermediária). No primeiro, avaliaram-se quatro diferentes concentrações padrão (100, 50, 25 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ) repetidas vezes ( $n = 3$ ), no mesmo dia, e em curto espaço de tempo entre as leituras. A precisão intermediária foi observada pela análise das amostras em triplicata por três dias diferentes. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR, calculado como a razão do (DP (intervalo de dados) / média (intervalo de dados)) \*100).

A exatidão, definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico, foi determinada calculando a porcentagem de recuperação da capsaicina em três níveis de concentração e a determinação de seu DPR (EQUAÇÃO 1). O valor da concentração média obtida para cada nível foi comparado com o valor teórico, que foi considerado ser 100%. O método é considerado validado quando os desvios de precisão e exatidão são inferiores ou iguais a 15% para cada nível de concentração, exceto para o nível referente ao limite inferior de quantificação, que pode ser de no máximo 20%. (BRASIL, 2012).

EQUAÇÃO 1. FÓRMULA UTILIZADA PARA DETERMINAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA AMOSTRA NO TESTE DE EXATIDÃO.

$$\text{Recuperação} = (\text{concentração média experimental} / \text{concentração teórica}) \times 100$$

A análise de LQ e o LD foram baseados em uma curva analítica própria obtida a partir da leitura das concentrações em triplicata dos padrões de 200; 100; 50; 25; 10; 2,5 e 0,75 µg/mL. Para sua determinação foram utilizados os valores da inclinação da curva (*slope*) e o desvio-padrão do intercepto com eixo y, de acordo com as equações abaixo (EQUAÇÃO 2).

EQUAÇÃO 2. FÓRMULAS UTILIZADAS PARA CALCULAR O LD (A) LQ (B).

$$(a) LD = 3,3 \times \sigma/S$$

$$(b) LQ = 10 \times \sigma/S$$

Notas :  $\Sigma$  é o desvio padrão médio do intercepto com o eixo y e s é a inclinação da curva analítica ou *slope*.

A robustez avalia a constância do método à pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Para isso, alterou-se a temperatura da coluna e da amostra (de 25 °C para 30 e 20 °C) e a velocidade de fluxo (de 1 mL/min para 0,9 e 1,1 mL/min). Os resultados foram expressos em porcentagem de recuperação e DPR.

### 3.3 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Dentre os vários métodos possíveis para o desenvolvimento de nanopartículas, selecionou-se o de coacervação otimizado por Langer e colaboradores (2003). A albumina sérica bovina foi solubilizada em água destilada (2 mL) e mantida sob agitação constante (200 rpm). Em seguida, com o auxílio de bureta, a capsaicina solubilizada em etanol (7 mL) foi adicionada por gotejamento à solução até a observação da turvação da amostra, ponto característico de dessolvatação no método. Ainda sob agitação, 51 µL do agente reticulante (glutaraldeído) foi adicionado de forma lenta (17 µL a cada 10 segundos). A solução foi permaneceu sob agitação e temperatura constantes mantendo os 200 rpm a 25 °C durante 24h. A técnica utilizada segue o que foi descrito na FIGURA 6. Este mesmo procedimento foi utilizado para obter nanopartículas vazias de albumina e polímeros carreando a capsaicina.

#### 3.3.1 DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS

Como já sabido, as condições do meio são fatores críticos para a característica final dos polímeros formados. Se baseando nesta constatação tornou-se necessário realizar uma

análise fatorial do tipo 4 X 2 para definir qual a influência que cada parâmetro exerce para se obter as condições ideais (nanopartículas com aproximadamente 200 nm, alta homogeneidade e porcentagem de eficiência de encapsulação, %EE). As variáveis analisadas são divididas em independentes e dependentes e podem ser observadas na TABELA 4. Para a variação dos pHs para 8 e 9 foi utilizado tampão fosfato em concentração adequada para se obter os valores pretendidos.

Os outros parâmetros possíveis de variação como velocidade e tempo de agitação, temperatura de incubação e solventes utilizados, foram mantidos como o preconizado por Langer et al. (2003) devido a prévia validação desses componentes. A combinação da análise fatorial 4 X 2 gerou 36 formulações distintas, as quais foram sintetizadas em triplicata e avaliadas as variáveis dependentes.

TABELA 4. PARÂMETROS UTILIZADOS NO ESTUDO DE DELINEAMENTO FATORIAL.

<b>Variáveis independentes</b>	<b>Valores</b>
Concentração de glutaraldeído	8 e 20%
Variação do pH	7, 8 e 9
Velocidade de adição da solução etanólica	1; 1,5 e 2,0 ml/min
Concentração da albumina (mg de albumina/mg de capsaicina)	3,33 e 6,66 mg/mg
<b>Variáveis dependentes</b>	<b>Valores desejados</b>
%EE	$\geq 80\%$
Diâmetro das nanopartículas	Desejado próximo a 200 nm

Os dados estatísticos obtidos referentes às variáveis dependentes foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com desdobramento dos graus de liberdade, seguido do teste de Tukey, e foram consideradas significativas com  $p < 0,05$ . O teste Tukey foi realizado segundo a EQUAÇÃO 3. De acordo com o teste de Tukey, duas médias são estatisticamente diferentes toda vez que o valor absoluto da diferença entre elas for igual ou maior que a dms (VIEIRA; HOFFMANN, 1989). A escolha do Teste de Tukey se deu devido a exatidão e simplicidade do método quando o número de repetições é o mesmo para todos os tratamentos, fato ocorrido nesta análise fatorial. Além disso, este teste é empregado para comparar todo e qualquer contraste entre duas médias de tratamentos.

EQUAÇÃO 3. FÓRMULA UTILIZADA PARA O TESTE DE TUKEY.

$$dms = q \sqrt{QMR/n}$$

Nota: q é o valor dado na tabela ao nível de significância estabelecido, QMR é o quadrado médio do resíduo da análise de variância e n é o número de repetições de cada um dos tratamentos, dms é a diferença mínima significativa.

### 3.3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS

Esta etapa se dividiu em eficiência de encapsulação, diâmetro e morfologia das nanopartículas, difração de raios-X, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, calorimetria diferencial de varredura, potencial *Zeta* e estabilidade das nanopartículas.

#### 3.3.2.1 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (%EE)

Para separar a capsaicina ligada aos polímeros da fração não-encapsulada procedeu-se uma análise do sobrenadante após dois processos de lavagens com água destilada e ultracentrifugação das formulações (duas centrifugações de 12.000 rpm por 30 min). Retirou-se uma alíquota do sobrenadante diluindo-a (1:100) em metanol e água (85:15, v/v). Em seguida, a amostra foi filtrada em membrana de poro 0,22 µm e analisada por CLAE (TÓPICO 3.2) para determinar a quantidade de capsaicina livre no sobrenadante e, conseqüentemente quantificar de forma indireta a capsaicina carregada pelo polímero que se manteve no precipitado após a centrifugação. As análises foram realizadas em triplicata para cada lote de polímero produzido. A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada a partir da EQUAÇÃO 4.

EQUAÇÃO 4. FÓRMULA PARA DETERMINAR A EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.

$$EE\% = (CAPSAICINA\ inicial - CAPSAICINA\ livre) / CAPSAICINA\ inicial \times 100$$

### 3.3.2.2 DIÂMETROS E MORFOLOGIA DAS NANOPARTÍCULAS

A determinação do diâmetro das partículas e o seu índice de polidispersão (IP) foi realizada inicialmente pela técnica de *Dynamic Light Scattering* (DLS). Após a etapa de centrifugação do meio reacional para retirar as impurezas e substâncias não englobadas pelo polímero, o precipitado foi novamente ressuspense. Alíquota de 10  $\mu\text{L}$  foi então retirada deste meio, diluída em 1,5 mL de água destilada e, enfim, analisada pelo DLS. As medidas foram feitas a 25 °C com ângulo de 90° e comprimento de onda 660 nm.

Para análises da morfologia e características estruturais determinantes na distinção do polímero como nanocápsula ou nanoesfera utilizou-se a microscopia eletrônica. As análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (CME – UFPR). Dois microscópios foram utilizados, microscópio eletrônico de transmissão e eletrônico de varredura com magnificação da amostra para 60.000 vezes.

As amostras analisadas foram divididas em dois grupos (com três lotes diferentes por grupo), nanopartículas de albumina com capsaicina e nanopartículas de albumina vazias (sem a adição da droga). As amostras em solução foram inicialmente centrifugadas a 20.000 rpm/20 min, descartou-se o sobrenadante e, pequena fração (10  $\mu\text{L}$ ) da amostra precipitada foi adicionada ao suporte porta-amostras do microscópio (*stub*) e espalhada uniformemente, onde permaneceu por 4 horas a temperatura ambiente (dentro do dessecador) até a completa secagem. A leitura foi realizada em triplicata com três lotes diferentes de nanopartículas para cada microscópio.

### 3.3.2.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

As medições de DRX foram realizadas no Laboratório de Materiais e Compostos Inorgânicos da UNICENTRO (LabMat/UNICENTRO) utilizando radiação Cu  $K\alpha$  em comprimento de onda de 1,54 Å à temperatura ambiente. A voltagem e a corrente aplicada foram de 40 kV e 20 mA, respectivamente. As amostras de capsaicina livre e nanopartículas de capsaicina foram acondicionadas em um suporte de amostras de vidro e digitalizados a partir de 5 a 60° em um ângulo de 2°  $\text{min}^{-1}$ .



#### 3.3.2.4 ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (EI-TF)

A análise de espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier foi realizada no Departamento de Química da UFPR. Para esse ensaio, as amostras, previamente secas a temperatura ambiente, foram preparadas em pastilhas de brometo de potássio (KBr) e analisadas na faixa de 700 a 1000  $\text{cm}^{-1}$ , resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Este preparo se deu pela homogeneização da amostra com KBr isento de umidade e compressão dos materiais (amostra de polímeros e KBr) em prensa hidráulica com controle manual. Os espectros obtidos a partir da análise da capsaicina livre foram comparados com os espectros de nanopartículas de albumina vazias.

#### 3.3.2.5 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

Análises de DSC foram conduzidas visando avaliar as interações entre a capsaicina e o polímero de albumina. Desta forma primeiro obteve-se o gráfico para a capsaicina livre a fim de definir o perfil de degradação da substância. Em seguida, o resultado foi comparado com a amostra de capsaicina nanoencapsulada em albumina.

As curvas de DSC foram realizadas no intervalo de temperatura de 0 até 250 °C, utilizando cápsulas de alumínio seladas hermeticamente, com massa de amostra em torno de 3,0 g, razão de aquecimento de 12,5 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.

#### 3.3.2.6 POTENCIAL ZETA (PZ)

A medida do PZ das dispersões de nanopartículas em água foram determinados por anemometria laser Doppler. As amostras foram acondicionadas em uma célula eletroforética a 25 °C, onde um potencial de  $\pm 150$  mV foi estabelecido. Os valores potenciais foram calculados como a média e DP dos valores da mobilidade eletroforética, repetidas 12 vezes.

#### 3.3.2.7 ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas de albumina vazias e com capsaicina foram avaliadas semanalmente durante 90 dias, em triplicata, por três amostras distintas (nanopartículas congeladas a -4 °C,

refrigeradas a 5 °C e sujeitas as mudanças de temperatura do ambiente). Os parâmetros analisados foram diâmetro médio, IP e liberação da capsaicina.

As análises de diâmetro médio e IP foram realizadas no DLS utilizando a mesma técnica previamente descrita. Já o valor da quantidade de capsaicina que estava sendo liberada sob repouso ao longo dos dias foi obtido utilizando a equação da reta da linearidade construída na etapa analítica (TÓPICO 3.2).

### 3.3 EXPERIMENTOS *IN VITRO* PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DA CAPSAICINA

Para os estudos *in vitro* buscou-se avaliar duas propriedades das nanopartículas, uma possível atividade antioxidante tempo-dose-dependente além da cinética de liberação do fármaco. O conhecimento da velocidade e constância da liberação nos permite criar um modelo de flutuação plasmática da droga a partir do carreador, o que ampliaria o conhecimento para a determinação de um possível regime terapêutico.

#### 3.3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O teste antioxidante foi realizado pela técnica de descoloração do cátion radical do ABTS (2,29-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), também conhecido como teste do radical ABTS•+ descrito por Re e colaboradores (1999). A formação do radical (ABTS•+) ocorre ao incubar o agente redutor (persulfato de potássio) com ABTS. O cátion radical absorve em 734 nm no ultravioleta e a redução desta absorbância caracteriza menor concentração do ABTS•+ no meio, ou seja, efeito antioxidante (Re et al., 1999).

Os testes foram realizados em tempos fracionados (0,5; 1; 3; 12; 24; 36; 48; 72h) com as capsaicinas livre e nanoparticulada em sete concentrações diferentes (98; 43; 25; 10; 1; 0,1; 0,025 µg/mL), além de nanopartículas de albumina vazia. O objetivo desta avaliação é determinar o efeito antioxidante tempo-dose dependente das formulações e, conseqüentemente, ter uma ideia prévia da velocidade de liberação da capsaicina a partir do nanopolímero.

A preparação do radical (ABTS•+) é realizada pela mistura aquosa de ABTS (7 mM) e persulfato de potássio (2,45 mM) incubada à temperatura ambiente e com ausência de luz por 12 h. No momento do uso, o produto resultante foi diluído em tampão fosfato 50 mM (pH

7,4) até obter absorvância próxima à 0,70 em 734 nm. A partir deste ponto, as diferentes concentrações foram incubadas em triplicata, com seus respectivos tempos.

A complexação entre o ABTS•+ e as amostras foi medida pelo decréscimo da absorvância após 30 min de incubação, em um leitor de microplacas. A quantificação da atividade antioxidante foi calculada como porcentagem de inibição do ABTS•+, de acordo com a EQUAÇÃO 5.

EQUAÇÃO 5. FÓRMULA UTILIZADA PARA CALCULAR O POTENCIAL ANTIOXIDANTE NO MÉTODO DE RADICAL ABTS.

$$\text{Inibição} = (A_c - A_a) / A_c$$

Note:  $A_c$  é a absorvância do controle e  $A_a$  é a absorvância da amostra. Os resultados são sempre tratados como módulo.

### 3.3.2 LIBERAÇÃO *IN VITRO*

O perfil de liberação *in vitro* da capsaicina a partir das nanopartículas foi determinado utilizando o sistema de células de difusão de Franz. Antes da realização do ensaio foram feitos testes para assegurar a solubilidade da droga no meio e obter o meio em condições sink. Em seguida, uma quantidade de solução de nanopartículas com capsaicina (1 mg/mL) foi misturada a 12 ml de tampão fosfato salino (PBS, pH 7.4, 50 mM) e 1% de PVA, adicionado para garantir a solubilidade no meio.

O meio receptor previamente desgaseificado foi adicionado a câmara receptora e mantido sob agitação constante (200 rpm) na temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C, utilizando um banho de circulação de água. Entre as câmaras doadoras e receptoras foi utilizada uma membrana de acetato de celulose com poros de 0,22 µm. Sobre a membrana foram colocados volumes específicos de nanopartículas que continham quantidades conhecidas de capsaicina (200 µg). Alíquotas de 500 µL foram coletadas em tempos pré-determinados (0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 12; 24; 36; 48; 60 e 72 h) e sujeitas a ultracentrifugação (15.000 rpm/20 min). Sempre que um volume foi coletado para análise, outro volume igual de meio de dissolução foi inserido a fim de se manter as condições constantes na célula.

A liberação acumulada de capsaicina foi calculada ( $n = 3$ ) pela determinação da quantidade de fármaco no meio receptor determinado pelo método analítico desenvolvido anteriormente. O tempo de liberação de 50% ( $t_{50}$  %) foi obtido matematicamente a partir da equação da linha de regressão.

### 3.4 ESTUDOS *IN VIVO*

O estudo *in vivo* foi aprovado pelo Comitê de Ética de Utilização Animal (CEUA) da UNICENTRO com o nº 038/2014 (Port. 1.351/2014 GR/UNICENTRO). Inicialmente foram adquiridos 40 ratos Wistar machos com 8 semanas de vida e peso de 280±25 g. Eles foram acondicionados em duplas por gaiolas com água e comida *ad libitum*, temperatura de 25 °C e ciclo diurno-noturno controlados. Estes animais foram divididos em 4 grupos: G1, G2, G3 e G4, os quais receberam por gavagem soluções diferentes. Isto é, G1 foi experimentado com solução etanólica de caspsaicina livre (CL), G2 recebeu solução de capsaicina nanoencapsulada em albumina (NC), enquanto G3 e G4 foram os controles negativos avaliados com nanopartículas de albumina vazias (NV) e apenas colução etanólica (veículo), tendo todos os grupos 8 animais cada.

Antes de iniciar os testes, foram realizadas avaliações piloto com 8 animais para definir as doses intraperitoniais, tempo de administração e a expressão de citocinas inflamatórias com solução etanólica de CL (1 mL) variando as concentrações. Administrações diárias de capsaicina por dias consecutivos nas doses de 5, 25, 50 e 60 mg/kg foram avaliadas por citometria de fluxo durante 15 dias (2 ratos por grupo), realizando punções de 1 mL de sangue nas horas 0 (antes da primeira aplicação) e, 24, 48, 72, 120, 240 e 360h (após a aplicação). A partir deste resultado foi selecionado o regime terapêutico que possa ocasionar alguma influência sobre a quantificação das citocinas estudadas (TNF-*alfa*, IFN, IL-2 e IL-4).

Cada rato teve seu peso aferido e recebeu injeção intraperitoneal diária com volume de 1,0 ml durante 3 dias consecutivos (concentração da droga e quantidade de dias de experimento foram definidos após as avaliações piloto). Três horas após a última aplicação, o sangue foi obtido por punção cardíaca para análises bioquímica, hematológicos e da expressão de citocinas, além da eutanásia dos animais seguida da retirada de alguns órgãos (coração, fígado, pulmão, testículo, rins e baço) encaminhados para análise histológica.

#### 3.4.1 EXPRESSÃO DE CITOCINAS

A avaliação da expressão de citocinas foi realizada a partir da coleta de sangue dos ratos e procurou avaliar a influência da administração aguda da capsaicina sobre as concentrações plasmáticas de TNF-*alfa*, IFN, IL-2 e IL-4. Esta avaliação pode ser dividida em três etapas, coleta, preparo da amostra e do reagente e, por fim, realização do ensaio. Todas as

etapas foram realizadas no mesmo dia, dentro de um período máximo de 12 horas, desde o início da coleta até o último exame.

Quatro grupos, sendo 2 grupos controles (NV e veículo) e dois experimentais (NC e CL) serviram de matriz para as amostras de plasma. Nos grupos experimentais, os ratos receberam por via intraperitoneal a dose de 50 mg/kg de capsaicina. Três horas após a última administração do terceiro dia de experimento realizou-se a coleta sanguínea por punção cardíaca, sendo os animais anestesiados com a associação de xilazina (5 mg/kg) e ketamina (40 mg/kg). Aproximadamente 5 mL de sangue foram coletados de cada animal, no entanto, uma quantidade mínima (< 1mL) foi necessária para a avaliação das citocinas, enquanto a maior parte foi direcionada para os exames bioquímicos e hematológicos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm e encaminhadas para a mistura com os reagentes da citometria de fluxo

Para que a análise possa ocorrer por citometria de fluxo foi realizada uma prévia curva de calibração com concentrações diferentes de citocinas ligadas aos seus *beads*, método conhecido como CBA (*Cytometric Bead Array*) (MITELMAN et al., 2009). Após a fase de coleta dos materiais sanguíneos os padrões liofilizados das citocinas do kit BD<sup>®</sup> CBA Mouse Th1/Th2 foram reconstituídos e diluídos de maneira seriada antes da mistura com os *beads* de captura e o reagente de detecção. A reconstituição dos padrões foi realizada com 2 mL do diluente de ensaio (solvente presente no kit utilizado ou adquirido separadamente pelo código 560104 BD<sup>™</sup> *Cytometric Bead Array* em tubo cônico de 15 mL somente com pipeta e ausência de agitação vigorosa, sendo esta solução denominada *Top Standard*. Posteriormente, deu-se início a diluição seriada com razão 2 até a diluição final de 1:256 (procedimento padrão para o kit empregado) (TABELA 5). Em cada tubo foi adicionado 300 uL do diluente de ensaio, em seguida outros 300 uL foram transferidos do *Top Standard* para o primeiro tubo, 1:2, misturando a solução somente com a pipeta. A diluição deu sequência transferindo outros 300 uL do tubo 1:2 para o 1:4, e assim sucessivamente, até chegar ao 1:256. Um tubo foi preparado apenas com o diluente de ensaio para servir como controle negativo, 0 pg/mL (OLIVER et al., 1998).

TABELA 5. CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS EM CADA TUBO AO TÉRMINO DA DILUIÇÃO.

Tubo	Concentração (pg/mL)	Diluição
1	0 (Controle negativo)	Sem diluição
2	20	1:256
3	40	1:128
4	80	1:64
5	156	1:32
6	312,5	1:16
7	625	1:8
8	1250	1:4
9	2500	1:2
10	5000	<i>Top Standard</i>

Para o preparo da mistura de *beads* de captura das citocinas Th1/Th2 primeiramente foi determinado o número de tubos de ensaio que seriam utilizados, incluindo padrões e controles. Neste experimento foram avaliadas 5 amostras desconhecidas, 9 diluições padrão de citocinas, e 1 controle negativo. Os *beads* de captura empregados foram para IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ .

Para cada amostra analisada foram empregadas as orientações propostas no kit Th1/Th2 para identificação das citocinas, com algumas modificações, onde se utilizou uma alíquota de 8 uL de cada *bead* de captura, a qual foi depositada em um único tubo de ensaio denominado mistura de *beads*. Essa mistura, como o próprio conceito se refere, é um conjunto de *beads* que possibilitam de uma única vez a identificação das quatro citocinas investigadas neste estudo. (CHEN et al., 1999). Portanto, em cada tubo de ensaio foram adicionados 32 uL da mistura de *beads*, previamente homogeneizada. A seguir, 32 uL dos padrões das citocinas Th1/Th2 foram adicionados aos respectivos tubos controle, listados anteriormente na TABELA 5. Das amostras desconhecidas foram retiradas alíquotas de 32 uL e depositadas em seus respectivos tubos de ensaio. Por fim, 32 uL do reagente de detecção foram adicionados em todos os tubos.

Posteriormente, todos os tubos de ensaio utilizados foram acondicionados ao abrigo da luz e temperatura ambiente por um período de 2 horas, tempo necessário para reação entre os *beads* e o reagente de detecção. Em seguida, adicionou-se 1 mL do tampão de lavagem em cada amostra analisada, as quais foram conduzidas para centrifugação por 5 minutos à 2.000 rpm. O sobrenadante de cada tubo foi descartado e mais 300 uL do tampão de lavagem foram adicionados para ressuspender o *pellet* de *bead* depositado no fundo do tubo (STALL et al., 1998). Ao término desse processo, as amostras foram conduzidas ao citômetro de fluxo

para leitura dos resultados. As concentrações de citocinas de cada amostra foram calculados comparando-se as leituras das amostras com os padrões conhecidos pela curva.

### 3.4.2 ESTUDOS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS

Como já mencionado item 3.4.1, após 3 horas da última administração, o sangue foi puncionado diretamente do músculo cardíaco dos animais, os quais estavam sob efeito anestésico (quetamina e xilazina intramuscular). O material para o exame bioquímico foi acondicionado em tubos de 5 mL, enquanto tubos de 2 mL foram utilizados na coleta do material para exame hematológico.

Os exames bioquímicos investigados foram uréia, creatinina, ácido úrico, glicose e TGP (transaminase glutâmico-pirúvica), enquanto que o hemograma completo foi avaliado para os parâmetros hematológicos.

Os valores de referência para parâmetros bioquímicos e hematológicos para ratos wistar podem ser observados no estudo de Branco e colaboradores (2011). Este estudo avaliou valores de referência provenientes do Biotério Professor Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

#### 3.4.2.1 ANÁLISES DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

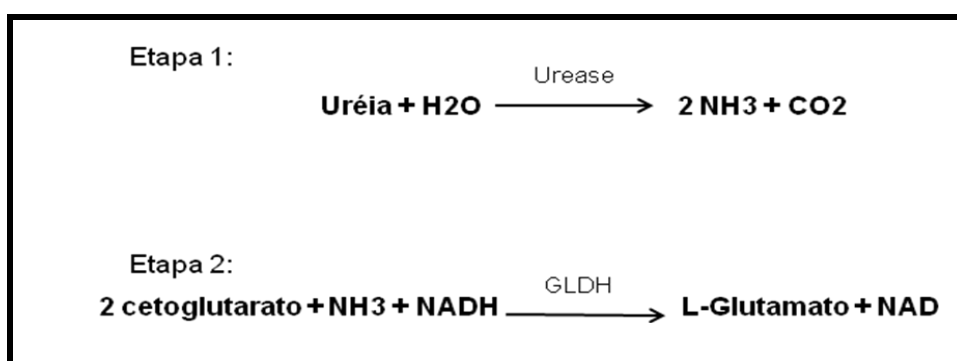
Os resultados bioquímicos foram obtidos utilizando-se aparelho automatizado Labmax 240 Premium® com volume de amostra de 30µL para cada exame (n = 3). Os kits utilizados têm princípio enzimático e foram adquiridos da empresa Labtest Diagnóstica SA®, sendo a creatinina e TGP de avaliação cinética, enquanto os demais mensurados por colorimetria. A metodologia detalhada por ser encontrada no próprio site da Labtest ([www.labtest.com.br](http://www.labtest.com.br)). As técnicas utilizadas para todas as dosagens bioquímicas séricas seguiram os protocolos dos kits comerciais utilizados da marca Labtest®.

##### 3.4.2.1.1 URÉIA

A determinação da uréia na circulação sanguínea é útil na avaliação da função renal. Para este teste foi utilizado o Kit Ureia UV Liquiform®, que se baseia em resultados colorimétricos. O princípio do método pode ser explicado em duas etapas reacionais. A

primeira ocorre pela hidrólise da uréia pela urease, gerando amônia e dióxido de carbono (ETAPA 1, FIGURA 7). A amônia formada reage com o 2-cetoglutarato e NADH (nicotinamida adenina dinucleótido hidreto) em uma reação catalisada pela enzima glutamato desidrogenase (GLDH), ocorrendo oxidação da NADH a NAD (ETAPA 2, FIGURA 7). A quantificação da uréia no plasma se dá por método indireto, pois a consequente redução da absorbância de NADH, medida por espectrofotômetro UV em 340 nm, é proporcional à concentração de uréia na amostra.

FIGURA 7. REAÇÃO ENZIMÁTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE URÉIA.



#### 3.4.2.1.2 CREATININA

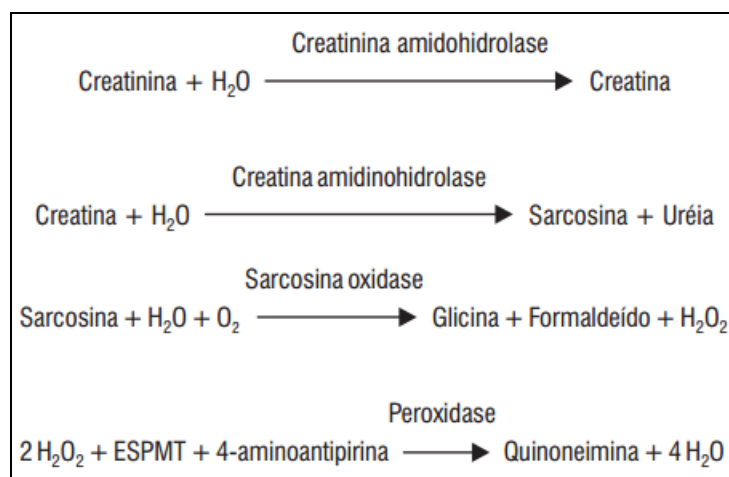
Assim como a uréia, a dosagem de creatinina é um dos marcadores de avaliação para função renal. Para quantificá-la utilizou-se o kit Creatinina Enzimática da Labtest® que possui as enzimas creatinina amidohidrolase, creatina amidinohidrolase e sarcosina oxidase em conjunto com a reação de Trinder. A abordagem enzimática confere maior especificidade à determinação do analito, eliminando a interferência de proteínas plasmáticas e outros cromógenos, comumente observada com os métodos diretos que utilizam a reação de Jaffé (JUNGE et al., 2004)

O princípio do método se baseia em reações enzimáticas em sequência (FIGURA 8), seguido por quantificação espectrofotométrica do produto final. A creatinina presente na amostra é convertida em creatina pela ação da enzima creatinina amidohidrolase. A creatina é então hidrolisada à sarcosina e uréia pela ação da enzima creatina amidinohidrolase. Em seguida, a enzima sarcosina oxidase promove a desmetilação oxidativa da sarcosina, levando à produção de glicina, formaldeído e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase, o peróxido de hidrogênio formado reage com o N-etil-N-sulfopropil.m.toluidina (ESPMT) e 4-



aminoantipirina, produzindo uma quinoneimina que tem máximo de absorbância no espectrofotômetro UV em 546 nm. A intensidade da cor do produto da reação é diretamente proporcional à concentração de creatinina na amostra.

FIGURA 8. REAÇÕES ENZIMÁTICAS UTILIZADAS NA QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DE CREATININA.

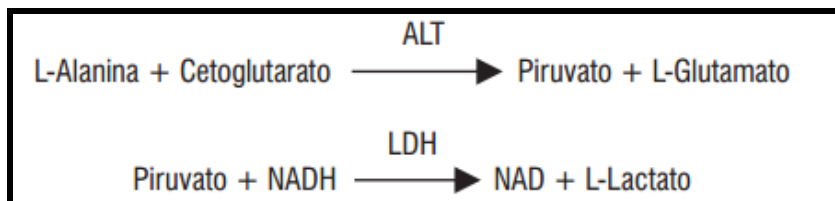


#### 3.4.2.1.3 TGP

O TGP é também conhecido como GPT (*glutamate-pyruvate transaminase*) ou ainda ALT (Alanina amino transferase). O TGP é um indicador de lesão hepática, pois quando estas células sofrem lise ocorre grande liberação desta transaminase na corrente sanguínea.

Para quantificação foi utilizado o kit ALT/GPT Liquiform<sup>®</sup> (referência nº 108 da Labtest) que se baseia na determinação em modo cinético via duas reações (FIGURA 9). A primeira justifica o nome ALT, o qual catalisa a transferência do grupo amino da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. O piruvato formado é então reduzido à lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que, a coenzima NADH é oxidada a NAD. A redução da absorbância em 340 nm, consequência da oxidação da coenzima NADH, é monitorada fotometricamente (UV), sendo diretamente proporcional à atividade da ALT na amostra.

FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO DAS DUAS ETAPAS QUE OCORREM PARA QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DO TGP.

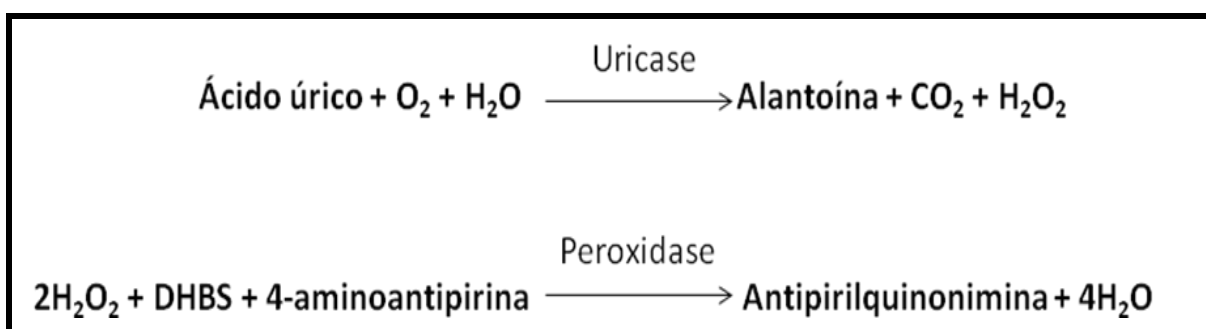


#### 3.4.2.1.4 ÁCIDO ÚRICO

Concentrações alteradas do ácido úrico podem indicar alterações metabólicas destes precursores e são comumente relacionadas com casos de disfunção renal, gota, leucemia, policetemia, arterosclerose, diabetes, hipotireoidismo ou ainda com algumas doenças genéticas (*e.g.* Doença de Wilson). A avaliação deste parâmetro busca avaliar também a função renal e como marcador de baixo custo para risco cardiovascular (KRISHNAN; SOKOLOVE, 2001).

O kit utilizado foi o ácido úrico (AU) Liquiform® (referência nº 140), que é um sistema enzimático para determinação do AU por reação de ponto final em amostras de sangue. Duas reações enzimáticas (FIGURA 10) sequenciais são necessárias para enfiar originar o cromogênio antipirilquinonimina, produto de cor vermelha, cuja intensidade mensurada em 520 nm será diretamente proporcional à concentração do AU na amostra.

FIGURA 10. ETAPAS REACIONAIS UTILIZADAS PARA QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DO ÁCIDO ÚRICO.

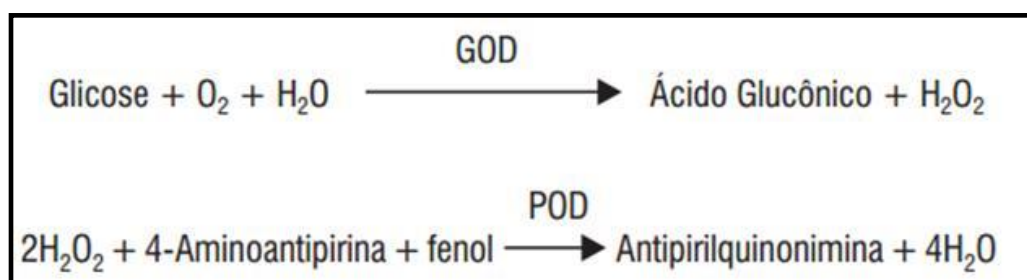


#### 3.4.2.1.5 GLICOSE

A quantificação da glicemia foi realizada por método enzimático cinético, kit glicose liquiform® (referência nº 133, Labtest). O princípio do método se baseia em duas reações enzimáticas (FIGURA 11) com formação do mesmo produto final observado na determinação

do ácido úrico, *i.e.* antipirilquinonimina. A glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose originando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Este último reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora de peroxidase, via reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina, cuja a intensidade de cor (comprimento de onda em 505 nm) é proporcional à concentração da glicose na amostra.

FIGURA 11. ETAPAS REACIONAIS PARA QUANTIFICAÇÃO DA GLICEMIA.



#### 3.4.2.2 ANÁLISES DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Os parâmetros hematológicos foram avaliados utilizando-se aparelho automatizado de hematologia BC-2300® e seus próprios reagentes. Uma alíquota de 100µL foi necessário para realizar as análises em triplicata.

Os leucócitos foram quantificados por contagem diferencial em lâminas coradas pela coloração hematológica rápida (panótico rápido, Laborclin®), técnica baseada no método de Romanowsky (Horobin, 2011). A amostra usada consiste em lâminas com extensões de sangue periférico, a qual é submetida à ação de um fixador e duas soluções corantes, por meio de imersões de 5 segundos em cada, e ao final da última imersão encontra-se pronta para leitura.

#### 3.4.3 ESTUDOS HISTOLÓGICOS

No terceiro dia de aplicação intraperitoneal das drogas, os ratos foram eutanasiados e, em seguida, dissecados para retirada dos pulmões, coração, rins, baço, fígado e testículos (FIGURA 12). Os órgãos foram conservados em formol a 10%, frasco de vidro com tampa larga e imediatamente conduzidos para o laboratório de histologia (Histocenter® - Anatomia Patológica e Citopatológica, Guarapuava/PR) para confecção das lâminas e elaboração dos

laudos pela Dra. Michelle Gusmão de Assis. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina/eosina e fotografados por câmeras acopladas ao microscópio.

FIGURA 12. EUTANÁSIA E RETIRADA DOS ÓRGÃOS (PULMÕES, CORAÇÃO, RINS, BAÇO, FÍGADO E TESTÍCULOS) PARA OS EXAMES HISTOPATOLÓGICOS.



### 3.5 AVALIAÇÃO ANTITUMORAL *IN VITRO*

No ensaio de citotoxicidade foram utilizadas células da linhagem de melanoma murino, B16-F10 ATCC, as quais foram mantidas em garrafas de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove's. O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL estreptomicina.

Visando manter a viabilidade celular, foram realizados repiques semanais. Primeiramente, o meio foi descartado e a garrafa lavada com tampão fosfato (PBS). Adicionou-se tripsina, a qual foi posteriormente inativada com 5 mL de meio. A cada repique foi cultivada a concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL, utilizando o método de exclusão do azul de tripano 0,4% para identificação das células viáveis. (HARRISON; RAE, 1997). Após repique as garrafas foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37 °C em atmosfera úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Para o ensaio citotóxico foram semeadas  $2 \times 10^4$  células/mL, em placas de 96 poços e incubadas por 24 h a 37 °C, com 5 % de CO<sub>2</sub>. Após as 24 h o meio foi removido, e as células tratadas com concentrações de capsaicina na sua forma livre e nanoencapsuladas, ambas diluídas em meio de cultura. As concentrações finais utilizadas de capsaicina livre (CL) e de

capsaicina nanoencapsulado (NC) foram de 1,95; 3,90; 7,81; 15,62; 31,25; 62,50; 125 e 250  $\mu\text{g/mL}$  (6,39; 12,79; 25,58; 51,16; 102,32; 204,64; 409,29 e 818,57  $\mu\text{M}$ ). Por fim, foram realizados os controles contendo, somente o meio, solvente (etanol) e nanopartículas de albumina vazias (NV). As placas foram então incubadas nos tempos de 24, 48, e 72 h a 37 °C, com 5 % de  $\text{CO}_2$ .

Para leitura das placas, após os diferentes tempos de incubação, o meio foi retirado e em seguida adicionado 50  $\mu\text{L}$  de MTT (1mg/mL) (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio), o qual foi submetido a mais 3h de incubação. O MTT é um corante que quando reduzido por células com integridade mitocondrial (principalmente a atividade das desidrogenases), forma o formazan, o que altera sua coloração amarelada para o azul. A quantidade de formazan pode ser determinada espectroscopicamente após solubilização em etanol absoluto. (DENIZOT; LANG, 1986). O MTT foi retirado e seus cristais resultantes solubilizados em 50  $\mu\text{L}$  de etanol, e 150  $\mu\text{L}$  de uma mistura na proporção 1:2 de PBS (pH=7,4) com álcool isopropílico. A absorbância proveniente da solução resultante foi lida em leitor de placas em 570 nm e 630 nm.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada usando ANOVA, com 5% de significância ( $p < 0,05$ ) e para comparar cada formulação foi usado teste de Tukey, ambos pelo programa OriginPro 8.6 (Northampton, MA, USA).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a finalidade de organizar os resultados de acordo com os objetivos propostos e do desenho experimental, eles também estão divididos em quatro partes, *i.e.* validação do método analítico, desenvolvimento e caracterização das nanopartículas, testes *in vivo* e testes *in vitro*.

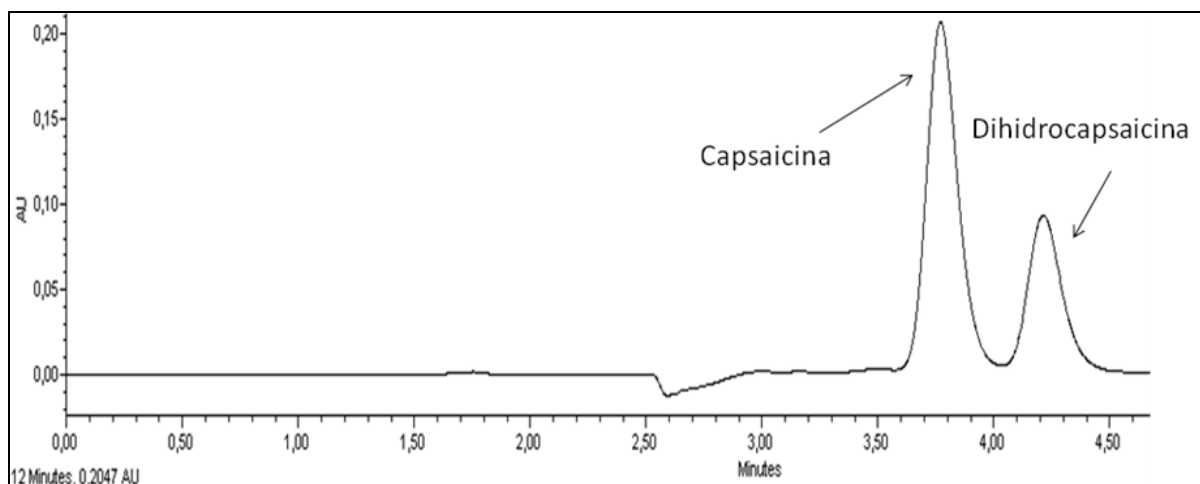
### 4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Esta etapa é considerada crítica para todas as outras que se seguem, pois qualquer falha na quantificação da capsaicina poderá gerar respostas equivocadas nas etapas experimentais *in vitro* e *in vivo*. A análise do cromatograma da capsaicina foi realizada através da escolha da melhor fase móvel para o presente estudo dentre as previamente descritas na literatura, isto é, água:acetonitrila (GUO et al., 2015; OTHMAN et al., 2011), metanol:acetonitrila (COLLINS et al., 1995) e metanol:água. (WAITE; ANDREW; CHANTHAI et al., 2012; NG; REUTER, 2015).

Inicialmente a amostra de capsaicina da Galena® foi testada na concentração de 50 µg/mL a fim de observar a formação do pico característico da capsaicina e, que este se forme simétrico e separado do pico da dihidrocapsaicina (impureza da amostra presente em menos de 10% da massa total). Várias proporções do modo isocrático para cada fase móvel assim como volume de injeção foram avaliadas. Como a coluna e o cromatógrafo utilizados no presente estudo são diferentes dos empregados nas pesquisas de referência para a escolha da fase móvel, logicamente os resultados também apresentaram diferenças. Dentre as várias opções analisadas a que demonstrou melhores resultados qualitativos dos picos e repetibilidade entre as análises foi a fase móvel água:metanol na proporção de 85:15 v/v, com fluxo de 1 mL/min. No entanto, o volume de injeção da amostra de 10 µL/mL utilizado inicialmente não promovia adequada sensibilidade com absorbância suficiente para testar concentrações menores e, com isso, não permitiria a construção da curva de calibração analítica. Para resolver esta dificuldade avaliou-se volumes de injeção de 25, 50 e 100 µL, optando pelo último devido a simetria e absorbância dos picos suficiente para realização da curva de calibração. O tempo de retenção da capsaicina foi observado em 3,8 min, enquanto a dihidrocapsaicina em 4,25 min, separação suficiente para identificar com clareza os dois picos e evitar a interferência entre eles, além de permitir a comparação com estudos prévios na literatura (FIGURA 13). Por exemplo, Ng & Reuter (2015) utilizaram volume de injeção de

10 µL e proporção de 80:20 (metanol:água) e detectaram também a separação das duas substâncias em um tempo de retenção um pouco menor.

FIGURA 13. CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DA AMOSTRA DE CAPSAICINA DA GALENA® NA CONCENTRAÇÃO DE 50 µg/mL, FASE MÓVEL ÁGUA:METANOL (85:15, V:V).



Nota: Fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 100 µL/mL e temperatura da coluna e amostra igual a 25±5 °C.

Segundo o laudo técnico fornecido pela empresa Galena®, a amostra de capsaicina possuía no mínimo 90% de capsaicina e o restante em dihidrocapsaicina. Entretanto, para confirmar a informação do laudo e determinar a concentração da capsaicina na amostra foram adquiridos 10 padrões analíticos, 10 mg cada de capsaicina ≥ 99.0 % de pureza (Sigma-Aldrich® – Código 12084). Os padrões foram avaliados em triplicata dentro dos mesmos parâmetros selecionados anteriormente. Os resultados confirmaram que a concentração da capsaicina ficou dentro dos valores informados pelo laudo (94 ± 3 %)

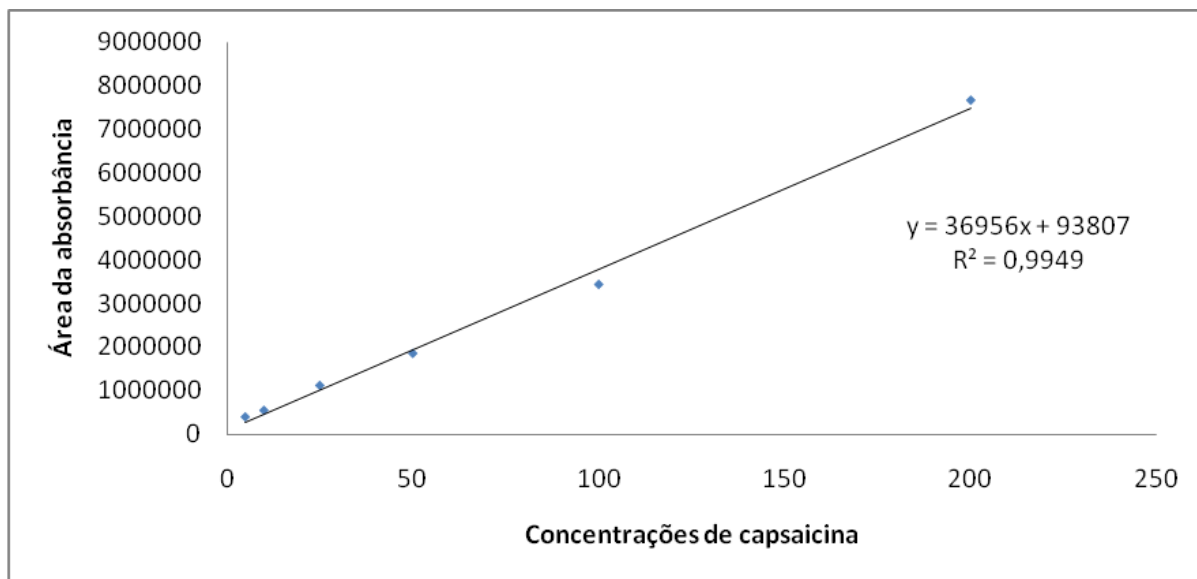
Segundo o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da Anvisa (2003), testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas só serão validados desde que alguns parâmetros sejam avaliados, *i.e.* seletividade; linearidade; intervalo; precisão; exatidão e robustez. Além destes testes foram ainda determinados o limite de detecção (sensibilidade) e de quantificação para que o produto se enquadre ainda dentro dos testes de performance, por exemplo, liberação do ativo.

#### 4.1.1 LINEARIDADE

Possuir uma técnica que quantifique de forma correta a concentração da capsaicina dentro de um intervalo especificado em relação a absorbância é o princípio da linearidade

utilizada pelo CLAE. Para determinar a linearidade foram selecionados 6 concentrações diferentes do lote de capsaicina da Galena® (200, 100, 50, 25, 10 e 5 µg/mL). Ao traçar a curva analítica foi possível observar que as concentrações demonstraram relação linear entre si, com coeficiente de correlação de 0,994 (GRÁFICO 2).

GRÁFICO 2. CURVA ANALÍTICA DA CAPSAICINA EM METANOL:ÁGUA (85:15, V/V) NAS CONCENTRAÇÕES DE 200, 100, 50, 25, 10 E 5 µg/mL, n=3.



Nota: Onde y é a área do pico e x é a concentração da solução padrão em µg/mL.

Pelo cálculo da equação de regressão e do coeficiente de correlação (r), pelo método dos mínimos quadrados a equação da reta foi obtida ( $Y = 36956x + 93807$ ). O valor de  $R^2$  igual a 0,994 obtido na curva analítica de 6 pontos ficou dentro dos parâmetros de validação da reta, o que indica linearidade no intervalo proposto com correlação fortíssima (BRITO et al., 2003). A validade do teste foi confirmada por análise de variância, que mostrou que a regressão linear foi significativa e o desvio da linearidade não foi significativo ( $p < 0,01$ ).

#### 4.1.2 EXATIDÃO

A exatidão do método analítico avalia se os resultados das concentrações do analito estão próximos do seu valor real na amostra. Este resultado é fundamental para dar confiabilidade na determinação das concentrações nas etapas de validação da eficiência de encapsulação e liberação *in vitro* da capsaicina.



A exatidão foi verificada como porcentagem de recuperação e desvio padrão relativo (DPR) da concentração média do analito em quatro diferentes concentrações (10, 25, 50 e 100 µg/mL) mensurados em triplicata segundo a EQUAÇÃO 1. O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação da amostra está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (BRITO et al., 2003). Logicamente o valor desejado é 100% de recuperação, entretanto, é sabido que possíveis erros associados ao preparo da amostra podem interferir no resultado. A média de recuperação de CAP para diferentes níveis de concentrações (10, 25, 50 e 100 µg/mL) foi encontrado ser  $101,83 \pm 0,52$  (RSD = 5,16),  $98,38 \pm 0,88$  (RSD = 3,58),  $101,76 \pm 1,23$  (RSD = 2,43) and  $100,38 \pm 1,37$  (RSD = 1,36), respectivamente.

Segundo os valores sugeridos pelo manual da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), de acordo com a concentração de capsaicina na amostra avaliada, considera-se aceitável um intervalo de recuperação entre 98 e 102%. Portanto, os dados confirmam a concordância entre os valores experimentais e teóricos.

#### 4.1.3 PRECISÃO

Segundo recomendações do ICH (2005) e da resolução nº 899 da Anvisa (BRASIL, 2003), a precisão tem por objetivo avaliar a proximidade dos resultados obtidos através de várias medidas efetuadas em uma mesma amostra. Ela pode ser expressa como o desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação (CV) de diversas medidas realizadas em três níveis: repetibilidade (intra-corrída), reprodutibilidade (inter-laboratório) e precisão intermediária (inter-corrída). Para cada etapa quatro concentrações diferentes foram avaliadas (10, 25, 50 e 100 µg/mL) em triplicata, porém o método de reprodutibilidade não foi realizado por falta de colaboração com outros laboratórios que disponibilizassem o mesmo equipamento de CLAE. A precisão intermediária foi realizada em triplicata em três dias diferentes.

Na TABELA 6 é possível observar os desvios padrões das avaliações inter- e intra-dia. O DPR médio das amostras foi de igual a 4,12. Porém, ao avaliar o DPR de cada amostra e sabendo que o valor máximo aceitável para confirmar a precisão é de 5%, conclui-se que a concentração de 10 µg/mL (DPR médio = 8,79%) ficou um pouco acima do aceitável, diferentemente das demais concentrações, as quais obtiveram a precisão dentro dos valores desejados. Por ser tratar de concentração baixa do analito e pela avaliação da exatidão ter sido

validado, é provável que erro aleatório no momento das diluições possa ter gerado o DPR acima do aceitável.

TABELA 6. ENSAIO DE PRECISÃO POR REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA AS AMOSTRAS DE CAPSAICINA EM 4 CONCENTRAÇÕES DIFERENTES (10, 25, 50 E 100 µg/mL).

Solução padrão (µg/mL)	Concentração quantificada ± DP (µg/mL)	DPR (%)
<b>Análise de repetibilidade</b>		
<b>10</b>	11,37 ± 1,47	12,92
<b>25</b>	23,18 ± 0,94	4,05
<b>50</b>	49,83 ± 1,60	3,21
<b>100</b>	100,66 ± 2,51	2,49
<b>Precisão intermediária</b>		
<b>Dia 1</b>		
<b>10</b>	10,45 ± 0,69	6,60
<b>25</b>	24,69 ± 0,68	2,75
<b>50</b>	51,41 ± 1,50	2,91
<b>100</b>	99,37 ± 0,82	0,82
<b>Dia 2</b>		
<b>10</b>	11,45 ± 0,89	7,77
<b>25</b>	25,27 ± 0,84	3,32
<b>50</b>	50,99 ± 1,16	2,27
<b>100</b>	100,12 ± 1,15	1,15
<b>Dia 3</b>		
<b>10</b>	10,02 ± 0,79	7,88
<b>25</b>	25,23 ± 1,05	4,16
<b>50</b>	51,29 ± 0,66	1,28
<b>100</b>	101,37 ± 1,00	0,98

#### 4.1.4 ROBUSTEZ

Todo produto que se deseja uma continuidade de produção e até mesmo aumento de escala para indústria deve ser avaliado pelo método de robustez. Ele indica o quanto o resultado varia dependendo de alterações sutis dos parâmetros analíticos empregados e até mesmo do ambiente de trabalho.

Para métodos analíticos que utilizam CLAE, alguns fatores que devem ser considerados na avaliação da robustez incluem temperatura e fluxo da fase móvel. Para

estimar o quanto a variação destes parâmetros poderia distorcer o resultado da amostra alterou-se a temperatura, da amostra e da coluna, de 25 °C para 30 e 20 °C e a velocidade do fluxo de 1 mL/min para 0,9 e 1,1 mL/min. Após a análise efetuou-se a interpretação dos resultados (TABELA 7).

TABELA 7. PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO E +-DPR OBTIDO NAS ANÁLISES DE ROBUSTEZ APÓS MODIFICAÇÕES NA TEMPERATURA E NA VELOCIDADE DE FLUXO (mL/min) (N = 3).

Parâmetros modificados	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	Média
Temp. 20 °C	100,34±0,34	100,44±0,92	99,71±0,43	100,88±0,31	99,89±0,79
Temp. 25 °C	102,40± 0,64	98,01± 0,82	100,36± 0,52	101,09± 0,50	100,46 ± 0,62
Temp. 30 °C	100,87± 0,95	99,43± 1,01	98,81± 0,32	101,02± 0,77	100,03 ± 0,76
Fluxo de 0,9	100,01± 1,34	102,34± 1,06	103,04± 0,39	98,97± 0,71	101, 09 ± 0,87
Fluxo de 1	102,40± 0,64	98,01± 0,82	100,36± 0,52	101,09± 0,50	100,46 ± 0,62
Fluxo de 1,1	102,01±0,78	99,59±0,33	100,31±0,45	101,22±0,59	100,19±0,71

O método é considerado robusto quando a porcentagem de recuperação e os valores de RSD indicam que as mudanças induzidas no meio reacional não ocasionam variação significativa nos resultados. O RSD máximo foi de 3,24%, obtido quando a concentração de 10 µg/mL foi avaliado sob o fluxo de 0,9. Como é estabelecido que o valor de RSD não pode ultrapassar 5% para que o método seja considerado robusto, os resultados apresentados confirmam a robustez.

#### 4.1.5 SELETIVIDADE

As avaliações da seletividade foram realizadas com o objetivo de responder se a albumina, glutaraldeído e etanol, componentes da formulação de nanopartículas proposta por Langer et al. (2003), poderiam influenciar no pico obtido para capsaicina.

Para responder a este questionamento, três lotes de nanopartículas foram preparados sem a adição da capsaicina ao meio reacional (nanopartículas vazias - NV). Após 24 horas sob agitação constante as soluções foram centrifugadas como descrito nos métodos de obtenção das nanopartículas (TÓPICO 3.3). Alíquotas do sobrenadante foram retiradas e dissolvidas na fase móvel (metanol:água, 85:15, v/v). Procedeu-se a leitura por CLAE, a qual

revelou que dentro da faixa de tempo de 0 – 10 min não ocorreu o aparecimento de nenhum pico dos componentes (álcool etílico, glutaraldeído ou BSA). Como o tempo de retenção da capsaicina ocorreu em 3,8 min (FIGURA 13), pode-se afirmar que o método possui seletividade para capsaicina dentro da faixa avaliada e não influencia também o pico de dihidrocapsaicina.

Uma segunda leitura também foi realizada ao misturar a capsaicina com álcool etílico, glutaraldeído e BSA. Entretanto, apesar da presença dos componentes da formulação o pico de capsaicina se manteve inalterado em comparação ao observado na FIGURA 13. Este resultado confirmou a seletividade do cromatograma para capsaicina nas condições estudadas.

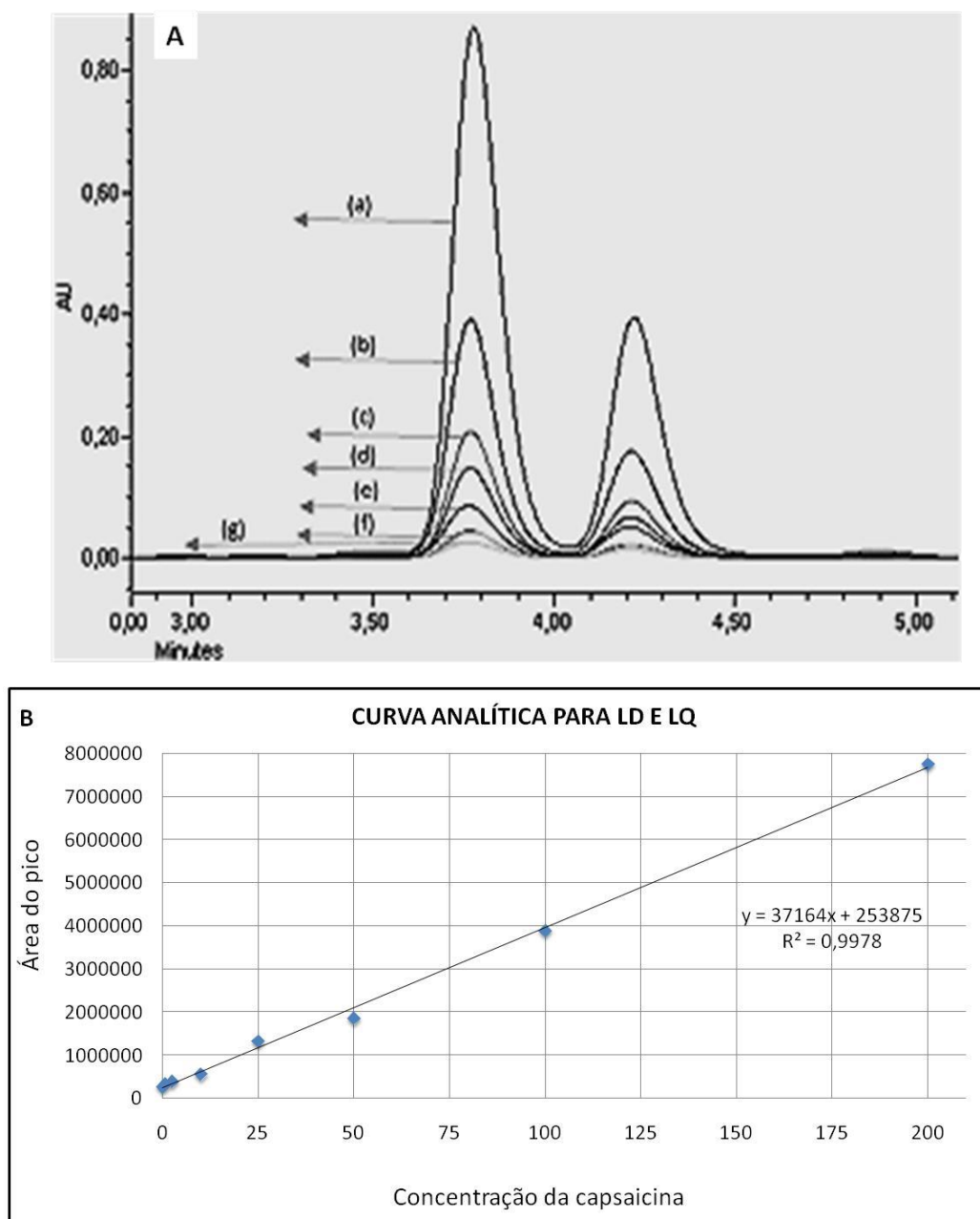
#### 4.1.6 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Quando se trabalha com amostras de baixíssima concentração como em nanotecnologia ou em testes de avaliação *in vitro*, dois parâmetros devem ser avaliados, LQ e LD. Eles determinam a sensibilidade do método, ou seja, a menor concentração de um analito que o procedimento consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo (LD) e a mais baixa concentração que pode ser quantificada (LQ) com certo limite de confiabilidade, geralmente entre 95% e 99%. (IMOTO; FREITAS, 2008; BRASIL, 2003).

Os parâmetros foram medidos a partir do desvio padrão de resposta e o *slope* obtido a partir da regressão linear de uma curva de calibração específica avaliando sete concentrações diferentes (200; 100; 50; 25; 10; 2,5; 0,75 µg/mL, FIGURA 14), 3 delas na região de baixas concentrações do intervalo previsto (ICH, 2005).

O método foi linear no intervalo avaliado (200 até 0,75 µg/mL), o que se comprova pelo valor do coeficiente de correlação de 0,997. No entanto, para determinar o LD e LQ foi necessário realizar em triplicata uma leitura amostral do branco e definir o desvio padrão destas análises. Pelos valores de ruído gerados após as leituras e a inclinação da reta alcançada (coeficiente angular da reta = 37209) foi possível definir o LQ como sendo 0,33 µg/mL e o LD igual a 0,10 µg/mL. Estes valores são próximos aos calculados em outros estudos (OTHMAN et al., 2011; JUANGSAMOOT et al., 2012), o que corrobora os resultados apresentados. Entretanto, deve-se ressaltar que estes valores foram obtidos com um volume de injeção de 100 µL, portanto, caso haja necessidade de reproduzir o experimento os mesmos parâmetros devem ser seguidos.

FIGURA 14. A. GRÁFICO DE CLAE DA CAPSAICINA COM 7 CONCENTRAÇÕES DIFERENTES: (A) 200; (B) 100; (C) 50; (D) 25; (E) 10; (F) 2,5; (G) 0,75  $\mu\text{g/mL}$ . B. CURVA ANALÍTICA PARA O LD E LQ.



## 4.2 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A escolha da albumina como polímero na construção das nanopartículas já está bem fundamentada em suas propriedades de biodegradabilidade, alta resistência, otimização da farmacocinética de fármacos, baixa opsonização e por ser excelente carreador plasmático.

Além disso, vários estudos validaram métodos de construção para tornar a albumina um nanocarreador com boa eficiência, no entanto, o que demonstra maior reprodutibilidade e baixo custo é o método de dessolvatação-coacervação otimizado por Langer (2003). Porém, cada formulação, dependendo das substâncias ativas, deverá ter as características do meio reacional adaptadas e reavaliadas, pois coeficiente de partição e a constante de acidez influenciam nas propriedades do produto final e interação com o polímero. Para definir quais parâmetros resultariam em formulações de diâmetros padronizados (aproximadamente 200 nm), fácil síntese e com alta eficiência de encapsulação um delineamento fatorial 4 x 2 foi realizado. Este delineamento (TABELA 4) foi proposto para avaliar os efeitos das variáveis independentes e de suas respectivas respostas sobre a %EE e do diâmetro das nanopartículas (variáveis dependentes). Dentro do desenho experimental propôs-se mensurar inicialmente os diâmetros das nanopartículas e depois a %EE de cada formulação para, enfim, determinar qual combinação será empregada ao longo do estudo.

#### 4.2.1 AVALIAÇÃO DO DIÂMETRO DAS NANOPARTÍCULAS DE CAPSAICINA

Dentre os parâmetros importantes após a síntese de uma possível nanopartícula estão o diâmetro, morfologia e a homogeneidade (índice de polidispersão, IP) dos polímeros formados. Uma das técnicas mais amplamente utilizadas para aferir o diâmetro das nanopartículas e o IP é a correlação de fótons, também conhecida como *Dynamic Light Scattering* (LI et al., 2014). O IP indica a homogeneidade nos diâmetros das partículas formadas. Eles podem variar entre 0 e 1, sendo que os valores desejados são iguais ou menores a 0,3, enquanto a elevação destes pode representar baixa padronização nos diâmetros das partículas em solução (AVADI et al., 2010).

Uma das primeiras características que deve ser avaliada antes do início da formulação de um nanocomposto é identificar o ponto isoelétrico (*isoelectric point*, IEP) do polímero, pois a presença de cargas aumenta a interação com o solvente e a repulsão entre as partículas. Este efeito é desejado para evitar a formação de conglomerados proteicos que provavelmente gerariam estruturas micrométricas. O IEP da albumina sérica bovina apresenta algumas pequenas diferenças entre os estudos que tentaram determiná-lo, variando entre 4,2 a 5,4. (ELGERSMA et al., 1990; NORDE; LYKLEMA, 2005). A fim de aumentar a confiabilidade sobre este valor proposto, a avaliação *in silico* fornece um resultado rápido, validado e sem custos adicionais a pesquisa. A sequência de resíduos de aminoácidos presentes BSA foi

obtida a partir do banco de sequenciamento Uniprot (código P02769, espécie *Bos taurus*) e, em seguida, foi submetida ao servidor *isoelectric.ovh.org* (KOZLOWSKI, 2007-2013). Este servidor foi criado com objetivo de calcular o IEP de proteínas a partir de várias fontes teóricas e bancos de resultados experimentais, *e.g.* ProMoST, Lehninger, Solomon, EMBOSS, DTASelect, dentre outros. Como resultado desta análise um IEP médio igual a 5,9 foi obtido. Portanto, uma faixa mais ampla variando de 4,2 a 5,9 foi utilizada como padrão para definir quais valores de pHs seriam avaliados. Decidiu-se então basificar o meio reacional em comparação a BSA em três pHs diferentes (7, 8 e 9) e avaliar a influência no diâmetro e índice de polidispersão das nanopartículas formadas.

Um total de 36 formulações (TABELA 8) diferentes foram obtidas pela análise fatorial, variando a concentração do glutaraldeído (8 ou 20%), pH do meio (7, 8 ou 9), velocidade de adição do etanol 98% (1, 1,5 ou 2 ml/min) e a proporção entre albumina e capsaicina (6,66 ou 3,33 p/p).

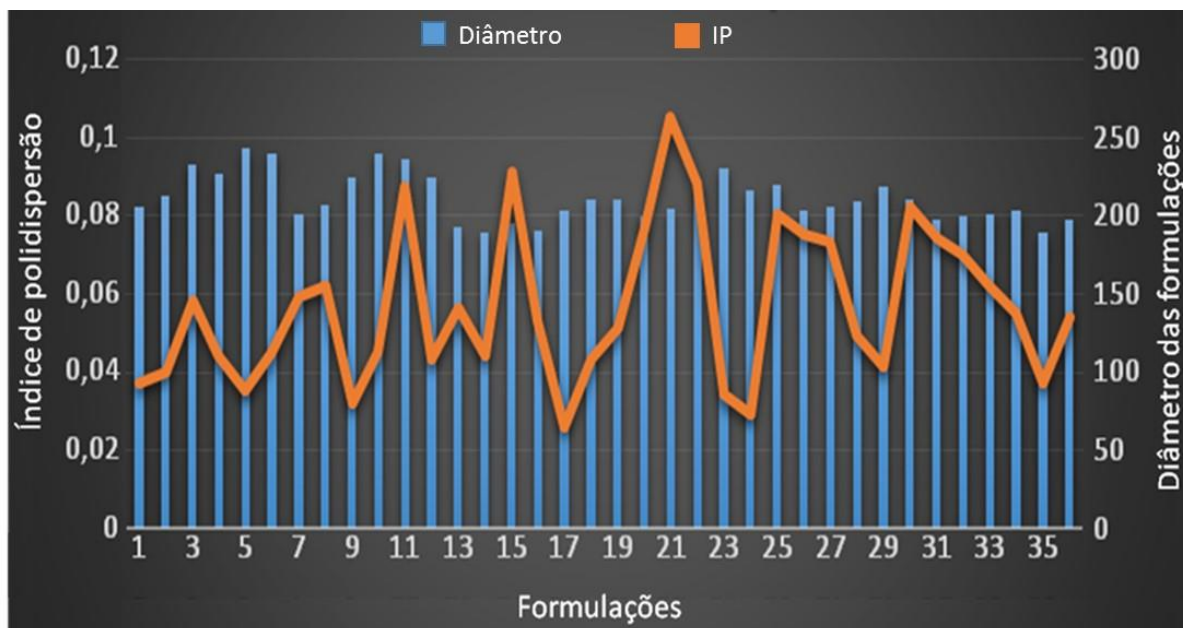
As três formulações (14, 15 e 16) que demonstraram os menores diâmetros (189 e 190 nm, DP médio = 25 nm) foram obtidas em pH igual a 9 (GRÁFICO 3). Se considerarmos o menor diâmetro na formulação com pH = 7 (Formulação 1), *i.e.* 199 nm, DP = 36 nm ( $n = 3$ ), fica evidente que não há diferença significativa entre os resultados com os pHs diferentes avaliados e, como a formulação com meio neutro não necessita de ajuste com solução tampão essa tem vantagens técnica e econômica na etapa de preparação, portanto, foi a selecionada à princípio.

TABELA 8. COMBINAÇÕES DESENVOLVIDAS PELO PLANEJAMENTO FATORIAL.

Formulação	Variações	Formulação	Variações	Formulação	Variações
1	8:7:1:3,33	13	8:9:1:3,33	25	20:8:1:3,33
2	8:7:1:6,66	14	8:9:1:6,66	26	20:8:1:6,66
3	8:7:2:3,33	15	8:9:1,5:3,33	27	20:8:1,5:3,33
4	8:7:2:6,66	16	8:9:1,5:6,66	28	20:8:1,5:6,66
5	8:7:1,5:3,33	17	8:9:2:3,33	29	20:8:2:3,33
6	8:7:1,5:6,66	18	8:9:2:6,66	30	20:8:2:6,66
7	8:8:1:3,33	19	20:7:1:3,33	31	20:9:1:3,33
8	8:8:1:6,66	20	20:7:1:6,66	32	20:9:1:6,66
9	8:8:1,5:3,33	21	20:7:2:3,33	33	20:9:1,5:3,33
10	8:8:1,5:6,66	22	20:7:2:6,66	34	20:9:1,5:6,66
11	8:8:2:3,33	23	20:7:1,5:3,33	35	20:9:2:3,33
12	8:8:2:6,66	24	20:7:1,5:6,66	36	20:9:2:6,66

Nota: As variações representam a concentração de glutaraldeído, pH do meio, velocidade de adição do etanol, proporção massa/massa entre albumina e capsaicina, respectivamente.

GRÁFICO 3. AVALIAÇÃO DOS VALORES DE DIÂMETRO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO DAS NANOPARTÍCULAS FORMADAS A PARTIR DA ANÁLISE FATORIAL CALCULADAS POR DLS.



O desenvolvimento do método de Langer (2003) adaptada neste estudo para capsaicina demonstrou que as características avaliadas se mantiveram dentro dos parâmetros desejados para todas as formulações, ou seja, diâmetro próximo a 200 nm e IP menores do que 0,3. A média obtida em todas formulações foi de 208 nm e nenhuma formulação apresentou IP maior do que 0,105, o que certifica o método como reproduzível, com baixa variabilidade e que sofre pouca influência sobre velocidade de adição do etanol e na proporção entre o carreador e a capsaicina (p/p)

No entanto, além da homogeneidade na forma das nanopartículas, é necessário avaliar se as mesmas conseguem carrear o fármaco com eficiência igual ou superior da encontrada na literatura para albumina.

#### 4.2.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (%EE)

Existem duas possibilidades de mensurar o quanto do fármaco foi nanoencapsulado, o método direto e indireto. Na técnica direta a mensuração é realizada através da lise polimérica e posterior quantificação da droga presente dentro do polímero. Ao mesmo tempo em que o método direto é uma medida com alta confiabilidade também se caracteriza como um processo de maior complexidade. Portanto, neste estudo optamos por um processo largamente



empregado, a quantificação indireta. Ela determina a quantidade do fármaco que não se associou ao carreador e, portanto, permanece livre nos solventes.

A %EE é uma medida essencial para mensurar o quanto do fármaco consegue ser carregado pelas nanopartículas de albumina e consequentemente possibilita o cálculo da dose. Por ser um polímero muito empregado como nanocarreador, existem resultados de %EE para várias substâncias diferentes com albumina, *i.e.* variando de 74,76 até 91,01 % para curcumina (JITHAN et al., 2011), 40,9 % para rodamina B (YU et al., 2014), 88,24 % para doxorrubicina (ABBASI et al., 2012), dentre outras. Portanto, é possível perceber que dependendo da substância utilizada a %EE também varia bastante, o que já era esperado, pois o carregamento depende da afinidade da substância com os sítios aceptores da albumina (BAKER, 2002).

A %EE foi determinada de modo indireto como relatado no tópico 3.3.2.1. Optou-se por avaliar inicialmente as formulações com pH igual a 7 (selecionadas anteriormente), caso a resposta não fosse satisfatória, outras formulações também seriam mensuradas (TABELA 9).

TABELA 9. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (%) DA CAPSAICINA NAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS EM PH IGUAL A 7.

FORMULAÇÃO	%EE	± DPR	FORMULAÇÃO	%EE	± DPR
8:7:1:3,33	98,3	7,4%	20:7:1:3,33	85,0	5,8%
8:7:1:1,6	96,5	8,1%	20:7:1:1,6	90,2	8,2%
8:7:2:3,33	56,4	4,5%	20:7:2:3,33	50,8	3,3%
8:7:2:1,6	64,8	9,5%	20:7:2:1,6	59,5	5,7%
8:7:1,5:3,33	85,1	5,6%	20:7:1,5:3,33	68,3	4,1%
8:7:1,5:1,6	81,2	7,8%	20:7:1,5:1,6	69,8	7,4%

Notas: As variações representam a análise fatorial previamente mencionada.

A partir dos resultados obtidos, observou-se que as formulações com adição de etanol a uma velocidade de 1 mL/min apresentaram %EE média de  $92,5 \pm 6,08$ , ou seja, uma eficiência maior quando comparado a adições mais rápidas, 1,5 ( $76,1 \pm 6,31$ ) e 2,0 mL/min ( $57,9 \pm 5,85$ ). Isso gera indícios que o processo de encapsulação do fármaco necessita de velocidade mais lenta na etapa de dessolvatação, ou seja, a adição rápida do agente dessolvante pode solubilizar a capsaicina e separá-la do contato com a albumina que estará em meio aquoso. Para confirmar esta hipótese e avaliar a velocidade ótima de adição, testou-se a dinâmica de 0,5 mL/min e os resultados de %EE foram equivalentes aos observados em 1

ml/min, o que confirma a relevância no controle da adição do agente dessolvante, no entanto, o diâmetro das nanopartículas se tornaram maiores, atingindo 450 nm, fato também relatado por Langer e colaboradores (2003). Há de se ressaltar que glutaraldeído em menor concentração, 8%, também apresenta uma melhor eficiência de encapsulação quando comparado as formulações com 20%. Isso talvez se deva a maior velocidade de formação do polímero que ocorre na concentração maior de glutaraldeído, dificultando a interação da capsaicina com os sítios aceptores da albumina bovina.

A partir destes resultados, a Formulação 1 (TABELA 8), a qual possui alta %EE e as características desejadas (diâmetro =  $205 \pm 25$  nm e IP = 0,037) foi selecionada como padrão para a continuação dos estudos.

#### 4.2.3 ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS

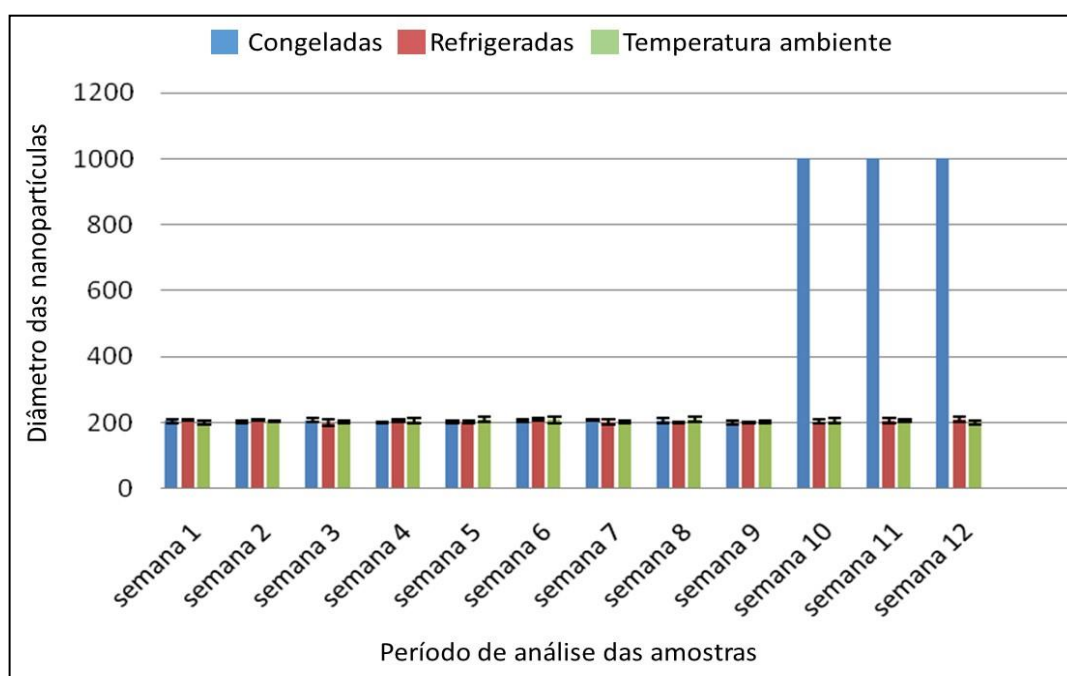
A avaliação da estabilidade de uma formulação é fator essencial para determinar por quanto tempo o produto manterá a qualidade inicial e, quais alterações podem ocorrer ao longo do tempo.

Após a obtenção das nanopartículas deve-se avaliar por quanto tempo o polímero se manterá estável e qual o perfil de liberação do protótipo durante este tempo. O material mantido como nanosuspensão pode sofrer algumas alterações resultando em sedimentação, aglomeração, crescimento dos cristais e até mesmo reações químicas. (WU et al., 2011). Deste modo, a avaliação da estabilidade é fundamental para definir o melhor método de estocagem e tempo de armazenamento sem que ocorra liberação do fármaco ou alteração de diâmetro e IP.

Para realização dos testes as amostras foram divididas em três grupos, formulações congeladas, refrigeradas e a temperatura ambiente, as quais foram conservadas, respectivamente, à temperaturas de  $-4^{\circ}\text{C}$ ,  $5^{\circ}\text{C}$  e de acordo com as condições climáticas diárias (experimento realizado durante o verão, temperatura média de  $25^{\circ}\text{C}$ ). Para cada situação experimental as amostras foram testadas em triplicata semanalmente durante 90 dias. Para evitar mudanças bruscas como congelamento e descongelamento durante as avaliações semanais, foram construídos lotes ( $n = 3$ ) para cada semana do experimento, os quais foram prontamente descartados após cada apreciação, com isso, um total de 108 lotes da Formulação 1 foram analisados. Os resultados (GRÁFICO 4) comprovaram que não houve alteração significativa no diâmetro das nanopartículas durante as 12 semanas de experimento, com

exceção dos lotes congelados que apresentaram características micrométricas nas três últimas semanas. O IP, novamente com exceção das três últimas semanas do material congelado, não ultrapassou 0,230, sendo considerado aceitável por estar abaixo de 0,3. Com isso, as três formas de armazenamento se mostraram capazes de estabilizar o diâmetro dos polímeros, sendo as formas refrigeradas e exposta as alterações de temperatura do meio mais estáveis do que a forma congelada. A menor estabilidade sob a forma congelada possivelmente ocorre devido a não adoção de nenhum método de crioproteção, com isso, as partículas tendem a se agregar com o tempo de exposição à baixas temperaturas.

GRÁFICO 4. PERFIL DE ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS ESTOCADAS EM TRÊS AMBIENTES DIFERENTES AO LONGO DE 3 MESES.

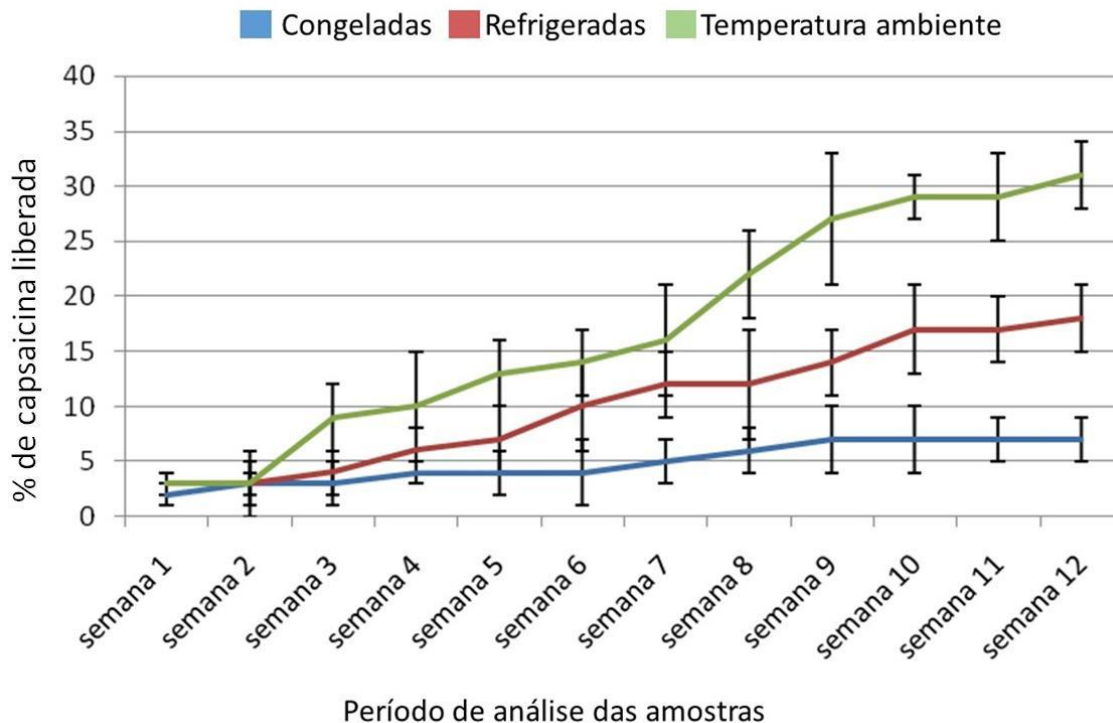


No entanto, apesar da estabilidade alcançada sobre o diâmetro das nanoformulações torna-se necessário verificar a liberação da capsaicina durante os três meses de estocagem. Para isso, alíquotas de cada lote foram avaliadas por CLAE utilizando a equação da curva de calibração obtida anteriormente para identificar a concentração da droga liberada ao longo do tempo. Os resultados foram expressos em porcentagem de recuperação da capsaicina e um perfil de liberação foi observado para as três formas de estocagem (GRÁFICO 5). Os lotes congelados demonstraram uma liberação mais lenta chegando ao final dos três meses com apenas 7% (DPR = 1,5%) da capsaicina liberada. Este resultado contrasta com as amostras expostas às variações ambientais de temperatura, as quais ao final do primeiro mês já tinham liberado 10% (DPR = 2%) da capsaicina presente nas nanocápsulas e com 90 dias atingiu

31% (DPR = 3,4%) de liberação. Os lotes sob refrigeração obtiveram perfil intermediário de liberação, com aproximadamente 18% (DPR = 1,7%) da capsaicina sendo liberada.

A maior estabilidade em meio congelado já foi observada em outros estudos, entretanto, a dificuldade de manter o diâmetro inicial também tem sido problema recorrente (ABDELWAHEDA et al., 2006; ANHORN et al., 2008; DADPARVAR et al., 2014). A consequência de uma estabilidade físico-química limitada, em função do tempo, constitui um obstáculo para a aplicabilidade industrial das suspensões aquosas de nanopartículas. Neste sentido, o interesse pelo desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas de nanopartículas é um ponto de convergência das pesquisas, que ainda necessita ser alcançado (SCHAFFAZICK et al., 2003). Infelizmente o processo de liofilização alterou as características das nanopartículas, por isso, resolveu-se trabalhar na forma de solução. A fim de comercializar esta formulação no futuro, uma otimização farmacotécnica se torna fundamental para possibilitar a liofilização do medicamento e a conservação a longo prazo sem a liberação do fármaco.

GRÁFICO 5. PERFIL DE LIBERAÇÃO DA CAPSAICINA DURANTE AS 12 SEMANAS ANALISADAS.



### 4.3 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS

A caracterização das suspensões engloba a avaliação morfológica, distribuição de tamanho de partícula, de massa molar do polímero, a determinação do potencial *Zeta* e da %EE, a cinética de liberação do fármaco e, ainda, a avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento (SCHAFFAZICK, et al., 2003). Alguns destes parâmetros já foram avaliados nos tópicos acima de que trata da construção e validação das nanopartículas. Porém, outros como potencial *Zeta*, espectroscopia de infravermelho, difração de raios-X, calorimetria exploratória diferencial, microscopia e estudos *in vitro* para caracterizar o perfil de liberação da capsaicina, reforçam a caracterização das nanopartículas.

#### 4.3.1 POTENCIAL *ZETA* (PZ)

Algumas características físico-químicas influenciadas por fatores extrínsecos (forças hidrofóbicas) ou intrínsecos (potencial eletrostático) orientam o comportamento dos polímeros, principalmente quando estes se encontram em solução. As cargas superficiais presentes nos polímeros caracterizam a superfície de potencial eletrostático, também conhecida como potencial *Zeta*, e são calculadas com base na mobilidade electroforética (MIYAKE et al., 2013). Em outras palavras, o PZ é a diferença entre o meio disperso e a fase estacionária ligada à partícula dispersa no meio (FIGURA 15).

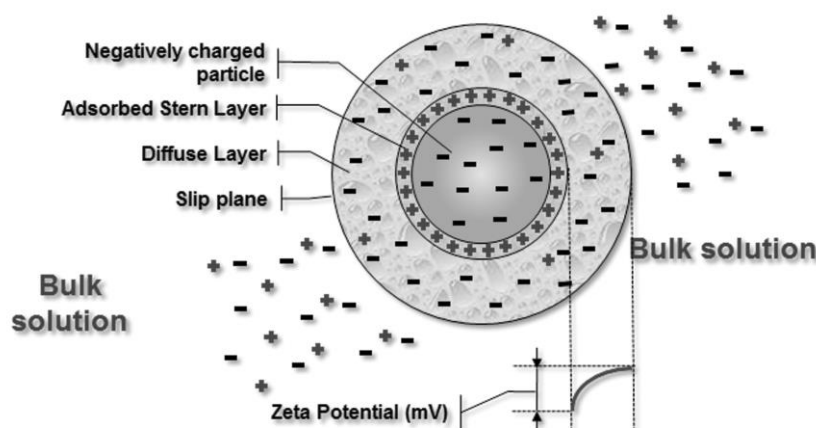
A medida do potencial *Zeta* fornece informações sobre a carga superficial das nanopartículas sendo outra característica importante que se deve determinar para prever ligações com outros materiais. Estas cargas mudam com a variação dos parâmetros experimentais e através deste potencial pode-se medir a magnitude das interações repulsivas entre partículas e avaliar a estabilidade destas em solução (NEVES, 2013). A formação e estabilização de partículas através de interações eletrostáticas caracterizam o PZ como um parâmetro fundamental a ser avaliado. O PZ de uma proteína consegue ser usado como indicador de estabilidade, pois ele determina o grau de repulsão entre partículas carregadas em uma dispersão, influenciando propriedades como, por exemplo, viscosidade, velocidade eletroforética e índice de polidispersão.

De acordo com os princípios gerais da química coloidal, um sistema disperso tipicamente perde estabilidade quando a magnitude geral do potencial *Zeta* diminui para menos de cerca de 30 mV (independente se a carga é positiva ou negativa). Uma suspensão coloidal com valores maiores que +30 mv e menores que -30 mv são, normalmente, estáveis.

Ou seja, quanto maior o PZ mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação. No entanto, caso ocorra aumento da instabilidade as proteínas tendem a se aglomerar, formando conglomerados poliméricos com aumento do diâmetro.

É de se imaginar que esta estabilidade superficial seja fortemente influenciada pela variação do pH do meio. Por exemplo, meio com pH básico torna o potencial *Zeta* mais negativo, enquanto que o pH ácido influencia positivamente o valor. Caso o valor do potencial *Zeta* atinja zero, ele se encontrará completamente desestabilizado e, este meio caracteriza o ponto isoelétrico. (NEVES, 2013).

FIGURA 15. REPRESENTAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DE UMA PARTÍCULA EM SOLUÇÃO.



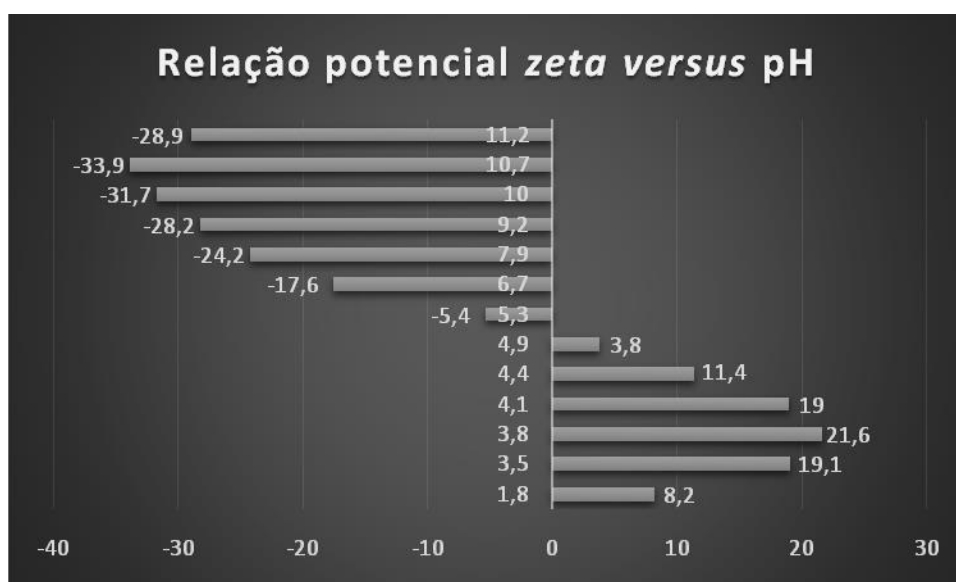
Fonte: Adaptado de Liou (2012).

A empresa Horiba Instruments® (HORIBA, 2009) avaliou o PZ da BSA em diferentes pHs (FIGURA 16). É possível observar que os valores são muito influenciados pela variação do pH, como se esperava. A partir deste documento pôde-se prever o resultado do *Zeta* para a análise da Formulação 1 desenvolvida, a qual se encontra em pH igual a 7,0.

Devido a faixa do potencial isoeletrônico da albumina (4,2 até 5,9) calculado previamente, era de esperar que valores de pH mais distantes, porém não extremos, apresentariam o PZ com valores mais próximos ou até mesmo superiores a 30 mV. Novamente os resultados experimentais corroboram o planejamento teórico do estudo, o que se torna ainda mais evidente ao observar o resultado para as nanopartículas de albumina com capsaicina, as quais apresentaram valores de -23,9 mV. Os valores observados em outros estudos, se considerarmos um valor de corte de  $\pm 5$  mV, ainda são muito divergentes,

caracterizando-se como mais estáveis (valores maiores do que  $\pm 28,9$  mV) do que o obtido no presente trabalho (NIKNEJAD; MAHMOUDZADEH, 2015), menos estáveis (valores menores do que  $\pm 18,9$  mV) (SEBAK et al., 2010), ou ainda, similares. (BANSAL et al., 2011). Isso induz a crer que as mudanças conformacionais ocasionadas pelo enovelamento e interação com as substâncias carregadas também influenciam o potencial *Zeta*, além da presença de soluções salinas (BANSAL et al., 2011). Portanto, uma comparação entre os valores sendo as substâncias nanoencapsuladas diferentes não pode ser utilizada como um parâmetro qualitativo para o resultado do *Zeta*.

FIGURA 16. RELAÇÃO ENTRE O POTENCIAL ZETA (MV) DA ALBUMINA E O VALOR DE PH DO MEIO (NÚMEROS DA COLUNA).



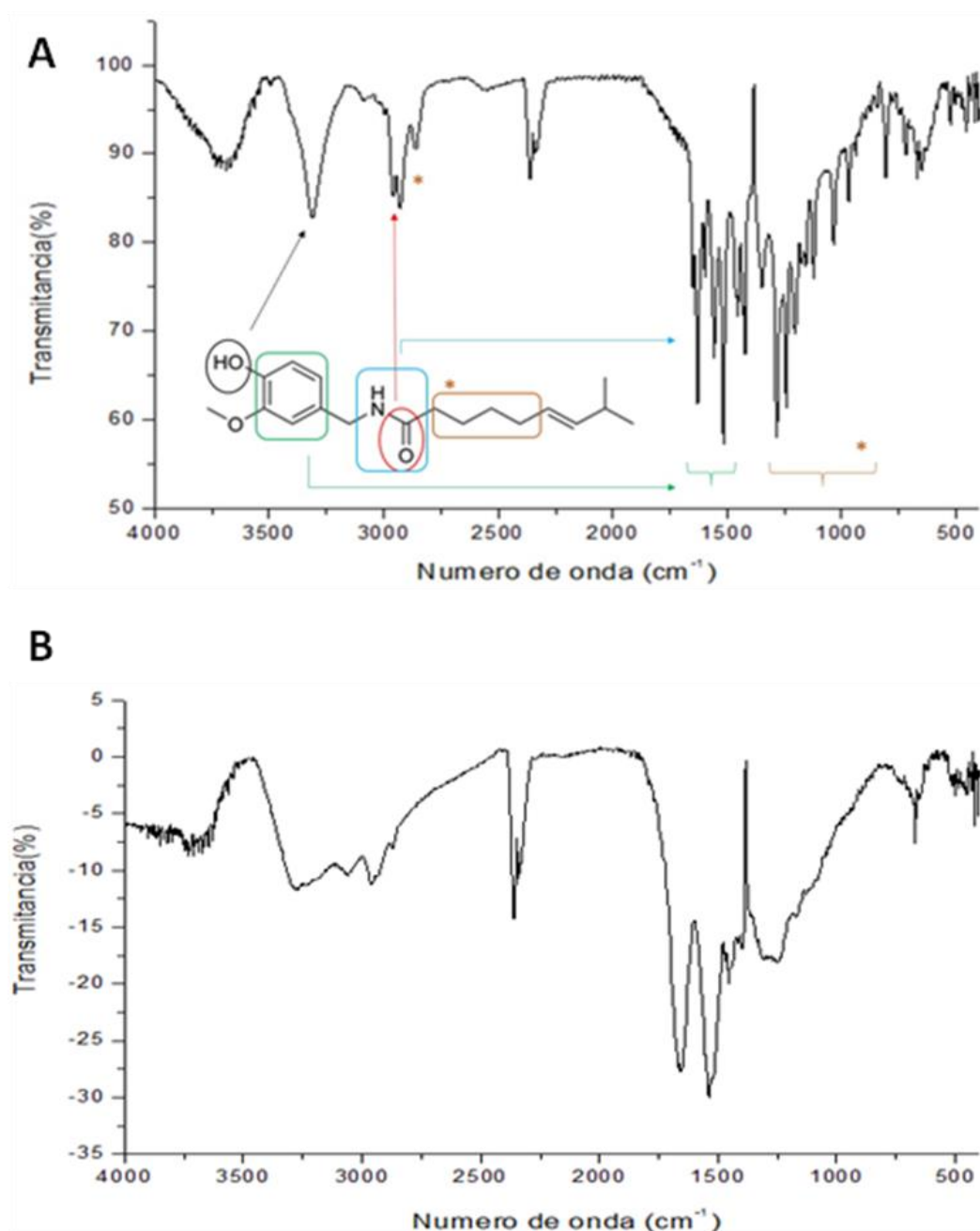
Fonte: Adaptado de Horiba (2009)

#### 4.3.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso de níveis vibracionais). O FTIR é uma técnica muito empregada no estudo de nanomateriais pois permite verificar se os componentes das formulações mantiveram a integridade estrutural após o processo de formação das nanopartículas e se ocorreu interação entre o polímero e o fármaco (AMRUTHRAJ et al., 2015).

Foram realizadas análises de FTIR de amostras com capsaicina livre e das nanocápsulas de capsaicina desenvolvidas. O espectro de FTIR da capsaicina livre demonstrou proeminentes bandas de absorção em 3.268, 2.962, 2.356, 1.660, 1.538, 1.455, 1.251, 1.128 e 823  $\text{cm}^{-1}$  (FIGURA 17).

FIGURA 17. (A) ESPECTRO DE FTIR DA CAPSAICINA LIVRE DESTACANDO OS PRINCIPAIS GRUPOS FUNCIONAIS DA MOLÉCULA RELACIONADA COM AS BANDAS DO ESPECTRO. (B) ESPECTRO DE FTIR PARA AS NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA COM CAPSAICINA.





A estrutura da capsaicina tem um anel aromático, um grupo polar e um grupo hidrofóbico (FIGURA 17, A). O banda em torno de  $3.268\text{ cm}^{-1}$  pode ser devido à água residual da amostra, porém é mais provável se referir ao grupo hidroxila da capsaicina. A banda em aproximadamente  $2.875$  é característica do grupo C=O da carbonila presente na capsaicina. A amida pode ser identificada na banda de  $1.660$ , região ( $1.500 - 1.900\text{ cm}^{-1}$ ) que também ocorre bandas características das insaturações do anel aromático. Já as ligações simples C-O e C-C são observadas nas vibrações entre  $800$  e  $1.300\text{ cm}^{-1}$ . Os grupos metilenos da capsaicina conseguem ser identificados na região entre  $3000 - 2760\text{ cm}^{-1}$ . A configuração *trans* do alceno pode ser observada na região de  $1668 - 1678\text{ cm}^{-1}$ . O comprimento simétrico C-O-C do grupo metóxi pode ser identificado na banda em  $1046\text{ cm}^{-1}$ , enquanto o estiramento assimétrico está em  $1.251\text{ cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN; et al., 2005).

Ao analisar o espectro FTIR para a nanopartícula de albumina com capsaicina (FIGURA 17, B) se observa a deformação das bandas do grupo carbonila e principalmente hidroxila, o que indica que a capsaicina interage com a albumina através destes grupos. Esta interação intermolecular deve ocorrer através de forças eletrostáticas dipolo-dipolo entre a hidroxila da capsaicina e os grupos sulfidril dos aminoácidos cisteínas, presentes em grande quantidade na proteína. As bandas características do anel aromático e do grupo amida ainda se destacam como bandas fortes, apesar de também apresentarem alargamento.

Se observarmos o espectro da capsaicina em outros estudos, por exemplo, o realizado por Peng *et al.* (2015), nota-se a ausência da banda em  $2.350\text{ cm}^{-1}$  tanto no espectro do fármaco livre quanto nanoencapsulado por metoxi poli(etilenoglicol)-poli( $\epsilon$ -caprolactona). Essa banda é característica da presença de nitrila e alcinos o que pode indicar a contaminação da amostra, a qual pode ter ocorrido no momento da manipulação para análise.

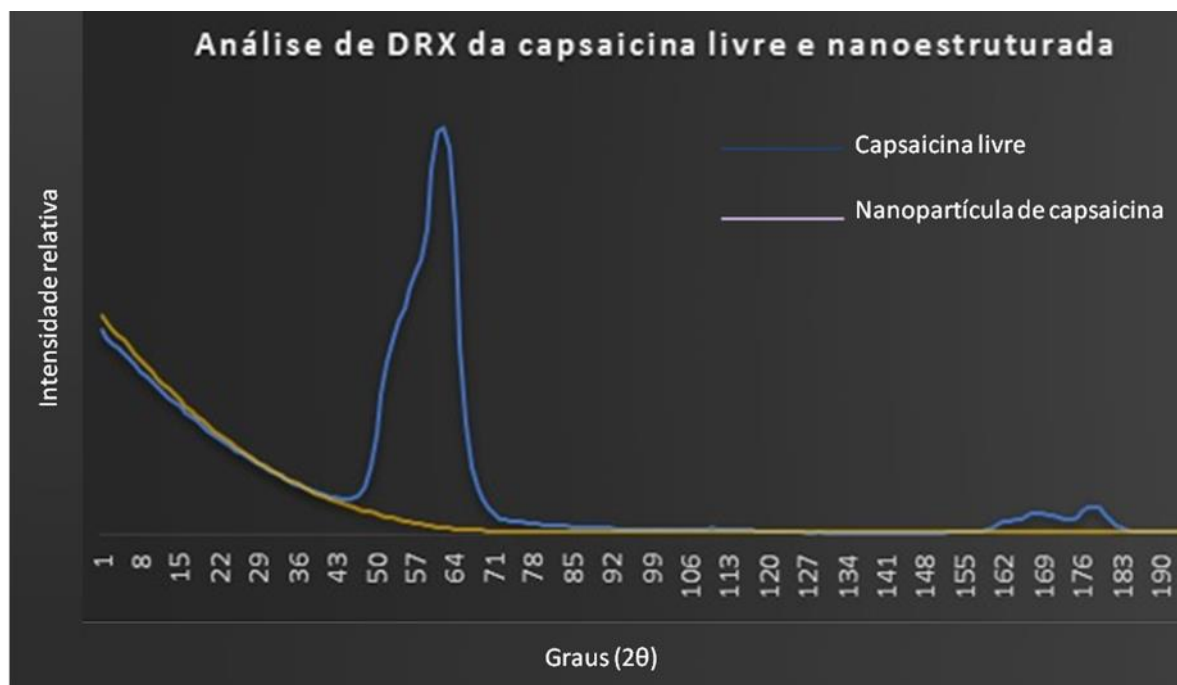
Entretanto, assim como no presente estudo, outros trabalhos também relataram a alteração na região conhecida como fingerprint ( $1400 - 800\text{ cm}^{-1}$ ) quando a capsaicina se encontrava nanoencapsulada. Isto se deve provavelmente devido a alguma modificação na característica do anel aromático como interação cátion-areno com a proteína, ou até mesmo a presença de ligação de hidrogênio entre o oxigênio da carbonila com aminoácidos polares (tirosina, serina, cisteína e treonina) do polímero (AMRUTHRAJ et al., 2015; HUANG et al., 2010).

#### 4.3.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

O DRX pode ser utilizado para várias funções como definir se uma estrutura possui característica amorfa ou cristalina, a estabilidade de determinada molécula frente variações de temperatura, mensurar o tamanho e uniformidade das partículas e avaliar a associação do fármaco ao polímero. Este último é o objetivo da análise dentro do presente estudo, pois determina a encapsulação pela ausência de formas cristalinas na associação de nanopartículas de BSA com capsaicina.

Os resultados de DRX da CL e das NC desenvolvidas estão representados no GRÁFICO 6. É possível destacar no difratograma da CL um pico intenso e bem definido em  $61^\circ$  e outro de pequena intensidade e base larga em  $178^\circ$ , característica de produto amorfo devido à elevação da temperatura. O pico de maior intensidade corresponde a capsaicina e vai de acordo com resultados descritos na literatura. (PENG et al., 2015). Contudo, o maior alargamento da base deve-se a presença da dihidrocapsaicina na amostra, capsaicinóide de característica físico-química semelhante.

GRÁFICO 6. DIFRATOGRAMA DO DRX DA CL (AZUL) E NA FORMA DE NC (AMARELO).



Ao avaliar as nanopartículas (GRÁFICO 6, traço amarelo) se observou mudança brusca na característica do espectro de DRX, tornando a formulação amorfa. Provavelmente isso ocorreu devido a interação entre a capsaicina com os sítios ativos aceptores da albumina

além da interiorização de algumas partículas no complexo polimérico. Essa dispersão das moléculas de capsaicina na albumina dificulta a formação de cristais do fármaco, o que confirma a amorfização representada no gráfico.

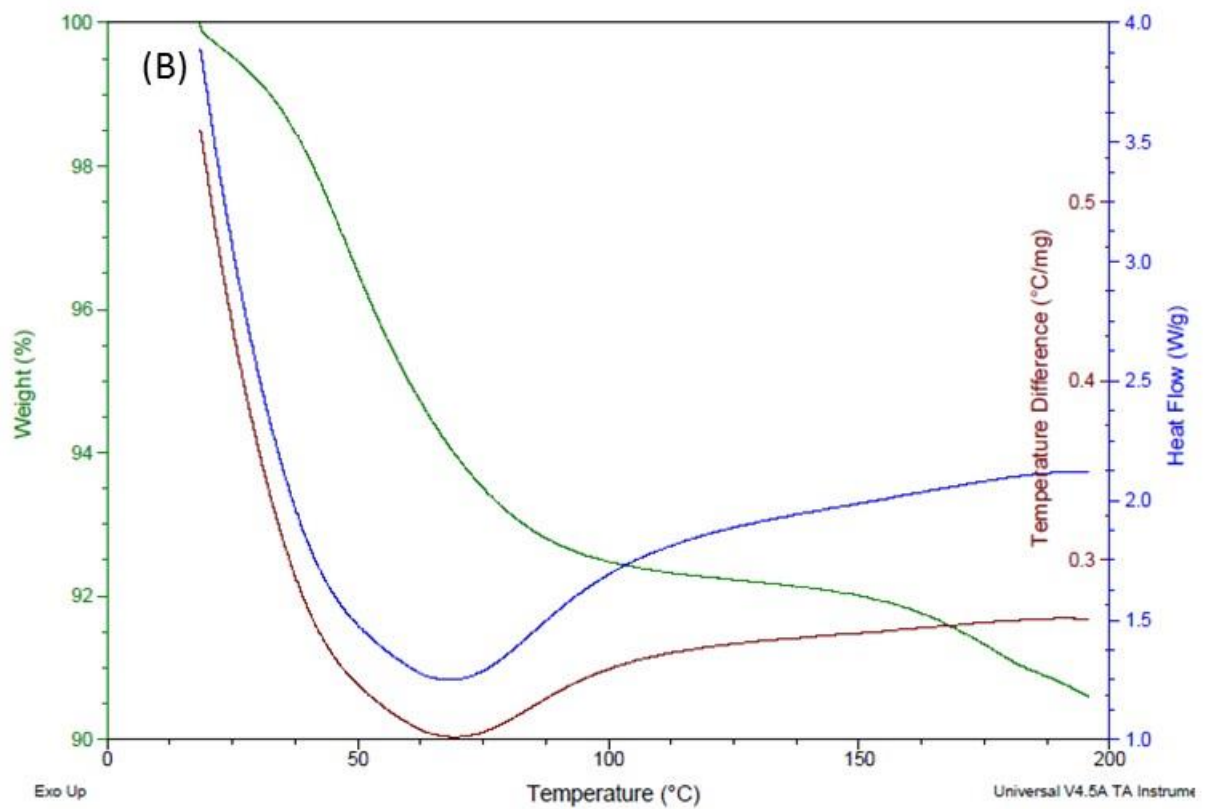
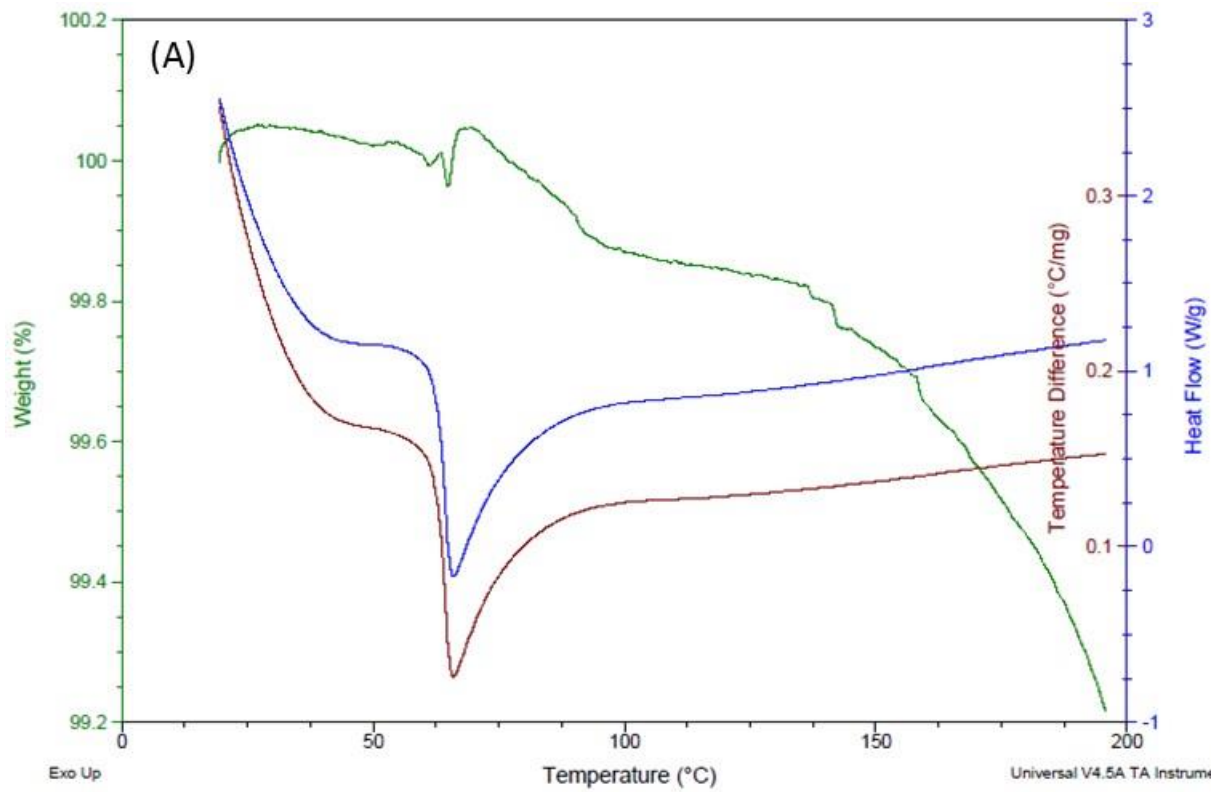
#### 4.3.4 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

O DSC é um método de análise térmica amplamente utilizado. Ele avalia a presença e a pureza de uma substância por meio da análise do pico de fusão, aplicando a lei de depreciação de Van't Hoff, a qual prevê a restrição do ponto de fusão do composto puro devido à presença de impureza (VAN DOOREN, 1984). Entretanto, além da aplicação sobre análise de impurezas, o DSC também auxilia na confirmação do revestimento polimérico de substâncias, bem como a avaliação de possíveis interações entre os constituintes. Dessa forma, foram analisados os comportamentos térmicos da capsaicina livre e após o processo de revestimento com BSA.

A FIGURA 18 ilustra o gráfico de DSC gerado para a capsaicina livre e nanoencapsulada. Como pode ser observado, foi verificado durante o ciclo de aquecimento da substância livre (FIGURA 18, A) um pico endotérmico com aproximadamente 65°C, característico da transição de fase (fusão do material), o qual foi consistente com estudos prévios (ZI et al., 2008; PENG et al., 2015).

Ao analisarmos a curva de DSC para a amostra de NC (FIGURA 18, B), é possível verificar a modificação do pico presente no termograma da capsaicina livre (A), ou seja, nenhum ponto de inflexão foi observado em 65 °C. Este fato comprova a interação fármaco-polímero nas nanopartículas. O pico de fusão característico da capsaicina, por volta de 65°C, comprova que ele está no estado cristalino anidro. Quando presente nas NC esse pico sofre um alargamento, indicando que houve solubilização da substância nos componentes do polímero. A modificação do pico proeminente nos nanossistemas ocorre devido à diminuição da cristalinidade da formulação e a presença do fármaco no estado amorfo (JAVADZADEH et al., 2010). O pico presente no termograma do polímero BSA é característico de transição vítrea. Esse fenômeno é marcante de substâncias plásticas, amorfas ou semicristalinas, como já havia sido indicado pelos resultados do DRX em outros estudos com NPs de albumina, o que suporta uma possível conjugação entre a capsaicina com BSA (TAHERI et al., 2011).

FIGURA 18. **A.** CURVA DSC OBTIDA PARA A AMOSTRA DE CAPSAICINA LIVRE NA FAIXA DE 0 - 250 °C. **B.** CURVA OBTIDA PARA A AMOSTRA DE CAPSAICINA NANOENCAPSULADA EM ALBUMINA.



#### 4.3.5 MICROSCOPIA

As análises previamente realizadas por DLS (tópico 4.2.1) forneceram o perfil de distribuição dos diâmetros, assim como o IP das nanopartículas. Porém, este método carece de imagens que avaliem, além do tamanho, também a morfologia das partículas. Carboni e colaboradores (2014), discutiram a importância do diâmetro e da morfologia das nanopartículas durante o processo de marginação, adesão e transmigração, processo que influencia a passagem dos polímeros a partir da corrente sanguínea para os tecidos periféricos. Concluiu-se que diâmetro próximo de 200 nm possui alta permeabilidade tecidual, mas que partículas *quasi*-esféricas apresentam maior superfície de contato com o endotélio, portanto, resultam em melhor transmigração quando comparadas as partículas esféricas, sendo crucial a migração do polímero. Isso também ocorre ao se observar que polímeros de tamanhos maiores demonstram menor velocidade de rotação em contato com o endotélio, consequentemente, apresentam maior tempo de inércia de rotação, o que facilita a marginação (LEE et al., 2009). Portanto, ao planejar o desenvolvimento de terapia com maior especificidade para o microambiente tumoral comparado aos tecidos normais, seria ideal a obtenção de nanopartículas *quasi*-esféricas de diâmetro em torno de 200 nm. Como ainda não há consenso sobre o resultado obtido de acordo com alterações nas densidades dos polímeros, este parâmetro não será avaliado no presente estudo.

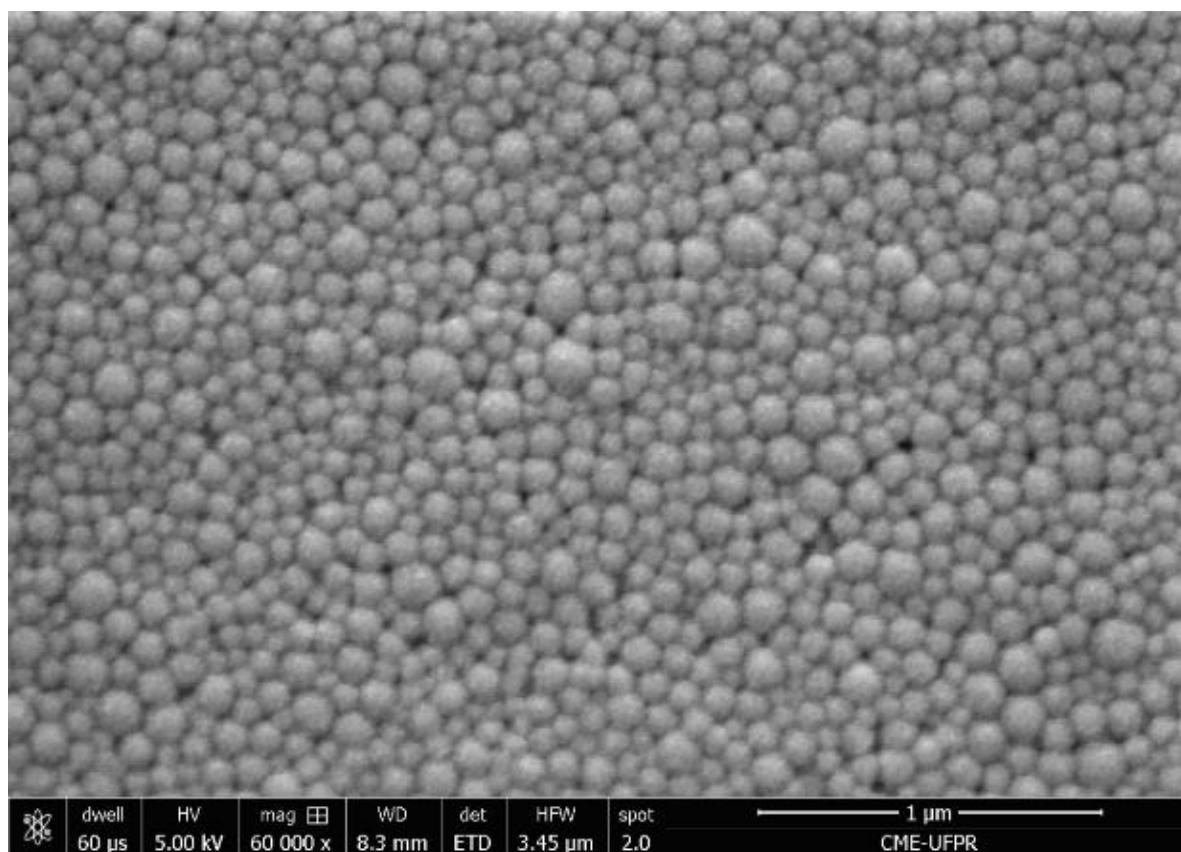
As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e de transmissão (MET) são muito empregadas na obtenção de informações relativas à morfologia e ao diâmetro das nanopartículas. Diferentemente das técnicas de microscopia óptica as quais utilizam fontes de luz e lentes para iluminar as amostras e obter imagens magnificadas, as eletrônicas utilizam feixes de elétrons acelerados ou lentes eletromagnéticas para gerar imagens de resoluções maiores, baseados em comprimentos de onda mais curtos do que os fótons da luz visível (RATNER et al., 2004).

Para realização dos experimentos microscópicos é necessário que as amostras estejam na forma sólida e secas. Contudo, as amostras não puderam ser liofilizadas devido a alterações físico-químicas já observadas em polímeros de albumina, o que se confirmou com a micronização ( $> 1.000$  nm) dos polímeros após a liofilização de algumas amostras-piloto avaliadas. Portanto, para substituir a liofilização, secagem à temperatura ambiente foi realizada diretamente no suporte da microscopia por gotejamento de 10  $\mu$ L da solução de NPs. As análises de MEV e MET foram realizadas experimentando três lotes diferentes (inter-dias) de

nanopartículas de albumina a fim de se avaliar se as amostras possuem homogeneidade morfológica.

O processo de secagem e ação dos elétrons pode causar alteração das características dos polímeros (BOOTZ et al., 2004; HALL et al., 2007), apesar disso, os lotes avaliados no MEV demonstraram uniformidade no tamanho e estreita distribuição de diâmetros (FIGURA 19). Interessantemente o diâmetro médio observado no MEV (185 nm) foi menor do que o calculado pelo DLS (205 nm) para os três lotes demonstrando uma variação quantitativa entre os dois métodos, porém ocorreu aumento também na heterogenicidade ( $IP = 0,201$ ), isso se deu, provavelmente, pelo processo de secagem. A morfologia dos polímeros confirmou que a forma desejada previamente, *quasi*-esférica, foi predominante nas imagens geradas.

FIGURA 19. AMOSTRA DE NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA COM CAPSAICINA AVALIADA POR MEV.

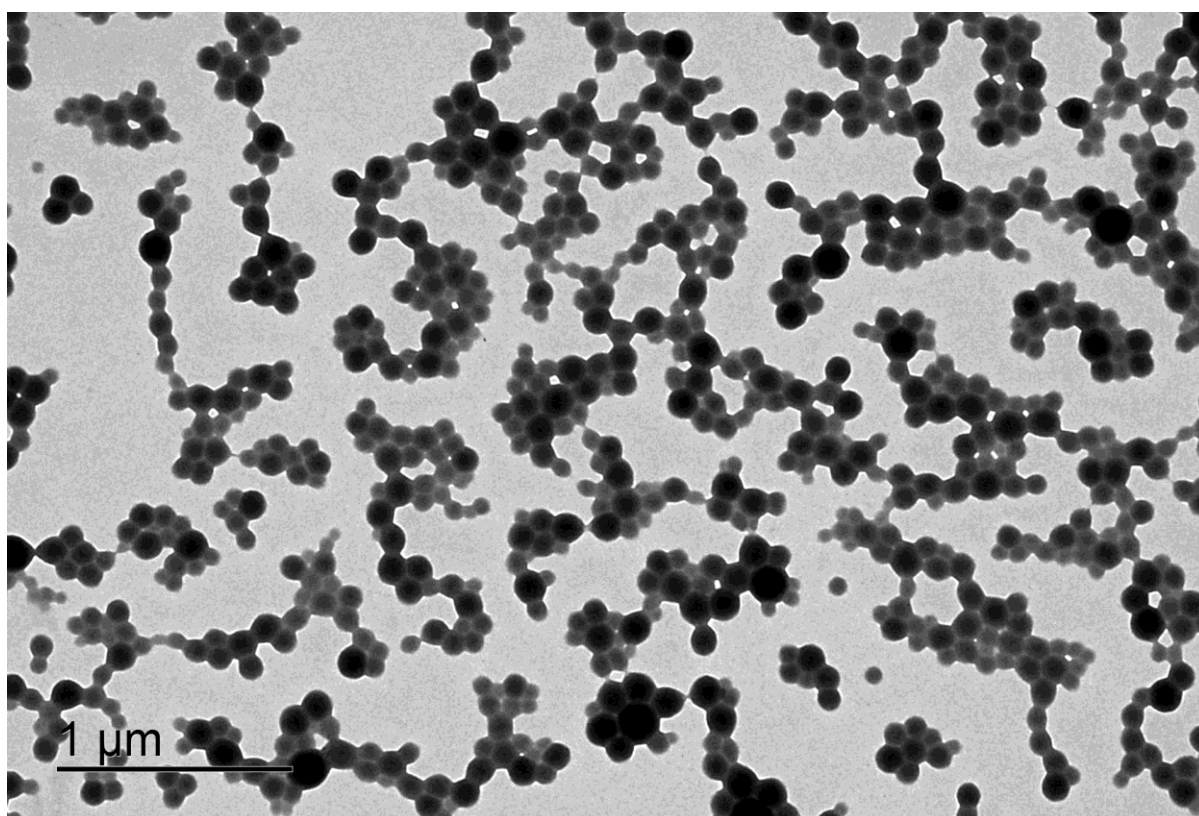


A MET é uma das técnicas mais frequentemente utilizadas para caracterização de nanomateriais (AMIJI, 2007; WANG, 2001; LIN et al., 2014). Assim como o MEV, a técnica de MET consegue revelar o tamanho e forma de nanomateriais, bem como graus de agregação e dispersão, porém, com melhor resolução espacial e capacidade adicional de medidas

analíticas. (HALL et al., 2007). Além disso, ela pode comportar também a distinção entre nanocápsulas e nanoesferas e, em alguns casos, a determinação da espessura da parede das nanocápsulas. No entanto, alguns inconvenientes acompanham as avaliações por MET, por exemplo, a destruição das amostras durante a análise e produção de artefatos provenientes das imagens em três dimensões, o que poderia confundir sobre a dimensão de algumas partículas. (WILLIAMS; CARTER, 2009).

As imagens geradas pelo MET (FIGURA 20) confirmaram os resultados de outros estudos, onde as nanopartículas de BSA se formaram como nanocápsulas ao invés de nanoesféras. (GUSTAFSON et al., 2013; QIAN et al., 2015; JUNG; ANVARI, 2012). Nanocápsulas quando comparadas as nanoesféras apresentam melhor perfil farmacocinético (liberação mais controlada), maior proteção ao fármaco e necessidade de menos polímeros para formar a partícula. (ASHTON, 2012).

FIGURA 20. ANÁLISE DE MET DAS NANOPARTÍCULAS COM CAPSAICINA.



Infelizmente não foi possível aumentar a resolução, pois o equipamento estava demonstrando perda do foco e as amostras sofriam a rápida degradação, isso impossibilitou o cálculo da espessura da camada externa da nanocápsula.

#### 4.4. ESTUDOS *IN VITRO* - LIBERAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os estudos *in vitro* no desenvolvimento das nanopartículas buscaram avaliar dois parâmetros, o perfil de liberação do fármaco e o potencial antioxidante da capsaicina de maneira dose-tempo dependente. De certa forma, como a avaliação antioxidante é dependente da capsaicina livre, os dois parâmetros serão discutidos em conjunto.

Estudos iniciais com extratos de pimenta revelaram potencial antioxidante que, a princípio foi relacionado com a presença de metabólitos como flavonóides, ácidos fenólicos, carotenóides, vitamina A, ácido ascórbico e tocoferóis. Porém, estudos adicionais revelaram que os capsaicinóides, em especial a capsaicina, presentes nos extratos eram os principais responsáveis pelas respostas antioxidantes (ROSA et al., 2002; MATERSKA; PERUCKA, 2005).

Apesar do potencial antioxidante observado pela capsaicina, este efeito é considerado 60 vezes mais fraco do que a resposta causada pela *alfa*-tocoferol, um dos mais importantes antioxidantes *in vivo* (OKADA; OKAJIMA, 2001). Como o efeito antioxidante é explorado em ambos, quimioterapia e prevenção de câncer (YANG et al., 2016; RALPF et al., 2010; VALKO et al., 2006), é fundamental avaliar se esta propriedade se mantém quando a capsaicina esta nanoencapsulada.

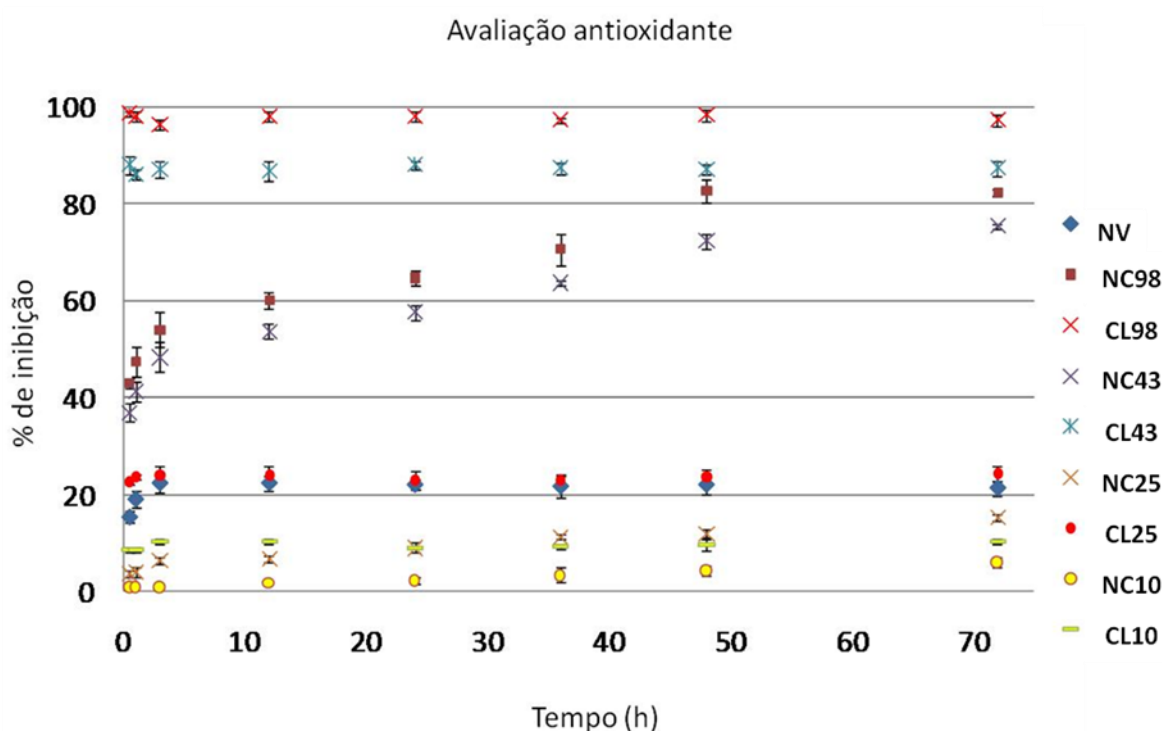
A avaliação da propriedade antioxidante foi realizada pelo ensaio de descolaração do cátion radical ABTS (ABTS<sup>•+</sup>), um dos métodos padrões aplicáveis para substâncias lipo e hidrossolúveis (RE et al., 1999). Para avaliar o perfil de resposta dose-tempo dependente da CL e NC, sete concentrações diferentes (98, 43, 25, 10, 1, 0,1 e 0,025 µg/mL) foram selecionadas além da NV durante 8 períodos de tempo diferentes (½, 1, 3, 12, 24, 36, 48 e 72 horas), entretanto, as 3 menores concentrações não demonstraram redução diferente do placebo, não sendo demonstrados no GRÁFICO 7.

A NV (concentração de 326,66 µg/mL de BSA) apresentou propriedade antioxidante média com redução de 21,12% do radical ABTS, com valor constante e não influenciado pelo tempo. Este resultado já havia sido observado em estudos anteriores para albumina sérica humana (ROCHE et al., 2008; ROZGA et al., 2013; TAVERNA et al., 2013) confirmando esta propriedade da proteína. Por isso, ela é considerada a principal molécula extracelular responsável por manter o estado redox no plasma (OETTL; STAUBER, 2007). O mecanismo proposto para esta propriedade se deve a característica da albumina de permitir a ligação de múltiplas moléculas em seus sítios aceptores, sendo uma espécie de armadilha para os radicais



livres circulantes (OETTTL; STAUBER, 2007). Ao se comparar as respostas das formulações CL10 e NC25 elas apresentam diferença estatística com pouco tempo (1/2-1h), no entanto, no intervalo de 3 - 48h as respostas se caracterizam como significantemente diferentes ( $p > 0.05$ ), o que muda novamente ao atingir 72h ( $p = 0.0007$ ).

GRÁFICO 7. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DA CAPSAICINA LIVRE (CL) E NANOENCAPSULADA (NC) (CONCENTRAÇÕES DE 98, 43, 25 E 10  $\mu\text{g/mL}$ ) E, DA ALBUMINA VAZIA (NV) DENTRO DA FAIXA DE TEMPO DE ½ ATÉ 72 h.



Se observarmos os resultados médios em todos os períodos de tempo para a capsaicina livre (CL) em diferentes concentrações, *i.e.* 98  $\mu\text{g/mL}$  (97,37%); 43  $\mu\text{g/mL}$  (88%); 25  $\mu\text{g/mL}$  (22,62%); 10  $\mu\text{g/mL}$  (9,62%); 1  $\mu\text{g/mL}$  (7,00%); 0,1  $\mu\text{g/mL}$  (6,37%); 0,025  $\mu\text{g/mL}$  (1,37%), conclui-se que a resposta é dose dependente e com característica aguda. A dose de 98  $\mu\text{g/mL}$  praticamente inibe a presença do radical ABTS de forma igual, seja no tempo de ½ hora ou 72 horas, enquanto a baixa concentração (0,025  $\mu\text{g/mL}$ ) apresenta resposta insignificante, apenas 1,37% maior do que o controle negativo (diferença da leitura da absorbância do radical ABTS).

Diferentemente da droga livre, a capsaicina nanoencapsulada (NC) demonstrou, além do perfil dose dependente, uma resposta tempo-dependente (diferença estatística confirmada por ANOVA). Esse resultado demonstra uma liberação lenta e constante da droga, perfil esperado com a formulação de nanocápsulas. Logicamente, se compararmos os resultados

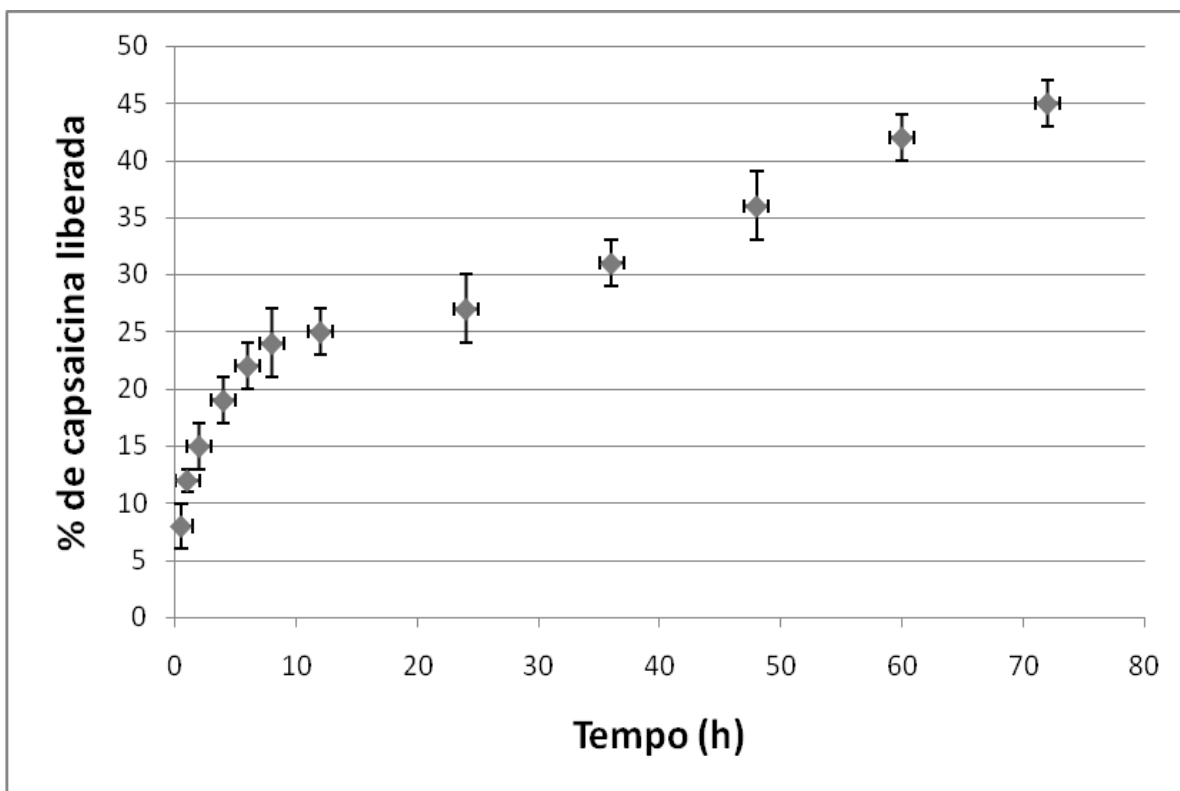
obtidos com a droga livre e no polímero, a primeira terá uma resposta mais intensa, porém somente aguda, enquanto que a droga carregada terá um perfil crescente, mas menos eficaz no resultado final em doses comparadas. No entanto, estas diferenças não significam que a droga livre seria a de escolha para um possível tratamento farmacológico, muito pelo contrário, o melhor perfil farmacocinético de liberação da droga nanoencapsulada a torna mais propícia à adesão de tratamento pelo paciente. A fim de atingir respostas agudas semelhantes as obtidas pela CL seria necessário apenas aumentar a concentração na formulação NC.

Este teste antioxidante fornece duas respostas de imediato, a formulação desenvolvida possui atividade no teste e apresenta perfil de liberação constante, mensurado de forma indireta pela redução do ABTS<sup>•+</sup>. Porém, para uma medida mais precisa da curva de liberação do fármaco o teste de liberação *in vitro*, o qual permite determinar o perfil farmacocinético da formulação, seria o preferível.

A solubilidade da capsaicina em meio de dissolução com PBS, pH 7,4, 50 mM contendo PVA (1%, m/v) foi determinado como sendo 0,2 mg/mL. A quantidade de capsaicina utilizada para o ensaio de liberação *in vitro* corresponde a 13% da sua solubilidade máxima, e considerando que o meio é constantemente restaurado, é possível afirmar que as condições sink foram mantidas durante o experimento.

Ao analisar os resultados ao longo do período avaliado (72h), observou-se um perfil de liberação bifásico (GRÁFICO 8). Nos primeiros 30 minutos, as nanopartículas já haviam liberado 8+-2% da capsaicina. Com 24 h, observou-se que 27+-3% da capsaicina havia sido liberada no meio, no entanto, após este período inicial a liberação tornou-se mais lenta, atingindo ao final de 72 h 45+-2% de liberação da capsaicina. Este perfil inicial rápido, seguido de uma liberação mais lenta e constante pode ser justificado pela característica de nanocápsula, a qual libera inicialmente os fármacos adsorvidos nas superfícies e depois de forma mais lenta os presentes em seu interior. Conclui-se que a liberação ocorre de forma rápida nas primeiras 12 horas, se mantendo constante e mais lenta nas próximas horas.

GRÁFICO 8. RESULTADO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA CAPSAICINA DENTRO DE UM PERÍODO DE 72H.



#### 4.5 ESTUDOS *IN VIVO*

Estudos *in vivo*, do latim “dentro da vida”, se referem aos experimentos que utilizam organismos vivos como forma de obter respostas biológicas à determinada situação. Testes com animais ou seres humanos são ambos considerados avaliações *in vivo* e quando comparados aos experimentos *in vitro* ou modelos *in silico* se aproximam muito mais da realidade.

A decisão de avaliar o efeito da capsaicina *in vivo* foi para determinar se ela, na forma livre e/ou nanoencapsulada, teria alguma influência sobre a expressão de citocinas relacionadas ao desenvolvimento e controle tumoral em ratos saudáveis. Além disso, a toxicidade também foi investigada através de exames bioquímicos, hematológicos e histológicos a fim de determinar possíveis alterações originadas durante a exposição ao fármaco. Como as nanopartículas do presente estudo são formulações desenvolvidas para administração parenteral e, devido ao volume e presença de solutos, o ideal seria realizar o experimento por via intraperitoneal. Os estudos sobre a toxicidade da capsaicina administrada por via intraperitoneal em ratos ainda são escassos e incompletos. Muralidhara e Narasimhamurthy (1988) avaliaram esta via em camundongos com a capsaicina em concentrações variadas (0,4; 0,8 e 1,6 mg/kg/dia) durante 5 dias consecutivos, porém, a

investigação foi restrita às possíveis lesões no epididimo, contagem de espermatozoides, além de peso e histologia testicular, as quais não apresentaram alterações significativas. (MURALIDHARA; NARASIMHAMURTHY, 1988).

Antes de iniciarmos os testes foram realizadas avaliações piloto com 8 animais para definir as doses intraperitoneais agudas e tempo de administração das formulações, as quais fossem altas, mas que não fossem fatais aos animais por via intraperitoneal. Apesar da  $DL_{50}$  aguda intraperitoneal para ratos ser de 12 mg/kg (FLORA et al., 2004), conseguimos trabalhar com doses de 50 mg/kg sem ocasionar a morte dos grupos experimentais. No entanto, quando as doses foram maiores do que 60 mg/kg os animais convulsionaram tônico-clônico e vieram a óbito, característica de overdose por capsaicina. Portanto, a concentração de 50 mg/kg foi a selecionada para trabalhar com os grupos experimentais por aplicações intraperitoneais.

A toxicidade aguda da capsaicina sofre ampla variação dependente da rota de administração da droga. Sato e Yamamoto (1996) investigaram os valores de  $DL_{50}$  por via oral em ratos e camundongos de ambos os sexos. Observou-se que os valores para as fêmeas foram de 97,4 mg/kg (camundongo) e 148,1 mg/kg (rato), enquanto os machos se mostraram mais resistentes 118,8 e 161,2 mg/kg para camundongos e ratos, respectivamente. Segundo o Diretório Geral da Comissão Europeia de Proteção à Saúde e Consumo (2002) administrações agudas, subcrônicas e crônicas da capsaicina podem gerar algumas alterações biológicas. Acredita-se que a administração aguda em doses letais leva a óbito devido à paralisia respiratória. (GLINSUKON et al., 1980). Danos morfológicos no sistema gástrico, duodenal e hepático também foram relatados após administração oral. (NOPANITAYA; NYE, 1974). Monsereenusorn (1983), observou em um estudo subcrônico (10-60 dias) que a administração oral de 50 mg/kg de extrato de capsicum em ratos reduziu as concentrações de uréia plasmática, glicose, triglicerídeos, colesterol total, ácidos graxos livres, transaminase glutâmico-pirúvica e fosfatase alcalina. Entretanto, não houve alterações patológicas e nenhuma diferença no peso dos órgãos, apenas uma ligeira hiperemia nos fígados e vermelhidão na mucosa gástrica. Contudo, outros estudos realizados com camundongos durante 14 meses apresentaram graves alterações histológicas nos rins, estômago, fígado e cavidade bucal, evoluindo para cirrose (49% dos casos) e degeneração glomerular em 50% dos casos (AGRAWAL; BHIDE, 1987; AGRAWAL; BHIDE, 1988; MURALIDHARA; NARASIMHAMURTHY, 1988).

O tempo de administração também foi investigado para saber se haveria alguma alteração na expressão de citocinas, ou até mesmo morte dos animais por efeito do regime

terapêutico consecutivo de altas doses. Durante 15 dias (2 ratos por grupo, dentro os 8 pilotos), tiveram seus sangues puncionados nas horas 0 (antes da primeira aplicação) e, 24, 48, 72, 120, 240 e 360h (iniciando 3 horas após a aplicação intraperitoneal de solução com CL). Como não houve diferença na expressão de citocinas entre os dias de coletas, a administração consecutiva durante três dias foi o tempo selecionado para realizar a expressão de citocinas, histopatologia e, alterações bioquímica e hematológicas em modelos agudos.

#### 4.5.1 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA

Ainda não há um consenso sobre as influências da capsaicina com os exames hematológicos e bioquímicos. Como supracitado, a administração subcrônica e crônica foi relacionada com redução da glicemia, triglicerídeos, colesterol total e ácidos graxos livres, a qual decresce com o tempo de administração (MONSEREENUSORN, 1983). Apesar do grande número de estudos de toxicidade, a maior parte é proveniente de extratos com capsaicinóides, sem controle de pureza e contaminantes, o que prejudica a confiabilidade do estudo e a extrapolação dos resultados para a capsaicina. Há carência de avaliações agudas com a capsaicina de pureza maior que 94% que considere todos os parâmetros investigados. Com isso, os exames bioquímicos avaliaram possíveis alterações derivadas de marcadores renais, hepáticos e fatores metabólicos. Na interpretação dos autores deste trabalho, seria insignificante mensurar marcadores cardíacos visto que a obtenção do material sanguíneo ocorreu via punção cardíaca. Os parâmetros hematológicos investigaram possíveis alterações imunológicas, na formação de glóbulos brancos e vermelhos e de coagulação.

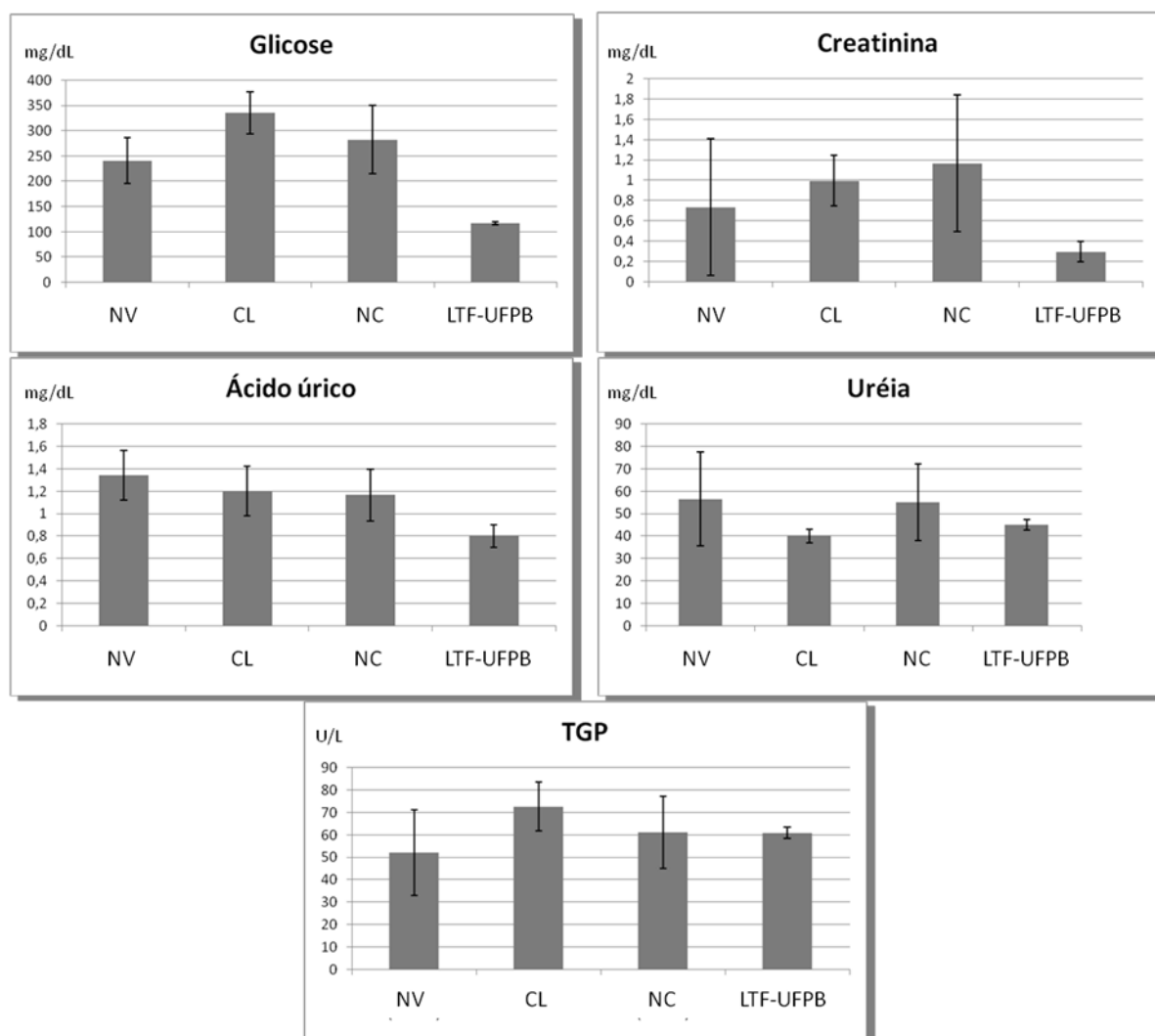
Os resultados obtidos para os grupos que receberam apenas o veículo (1 mL de etanol 3%) e nanopartículas vazias (NV) não tiveram diferença, portanto, o grupo NV foi utilizado como controle negativo para discutir os resultados. Há grande discordância entre os parâmetros hematológicos e bioquímicos para ratos wistar e, para tentar solucionar essa falta de padronização Branco e colaboradores (2011) avaliaram valores de referência provenientes do Biotério Professor Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Esses valores foram utilizados como controles de referência externo.

O exames bioquímicos (GRÁFICO 9) em sua maioria não apresentaram diferenças estatísticas entre si, porém alguns pontos podem ser discutidos por estarem em contrariedade à literatura. Extratos do gênero *capsicum* demonstraram aumentar a secreção de insulina,

reduzir a de glucagon e, consequentemente reduzir a glicemia (MÓZSIK, 2014; CHAIYASIT et al., 2009). Entretanto, em nosso estudo o grupo NV teve o nível de glicemia reduzido em relação ao grupo CL ( $p < 0,05$ ), mas equiparado ao grupo NC. Devido ao tempo de liberação da droga observado nos testes *in vitro* (GRÁFICO 8), essa menor biodisponibilidade da capsaicina nanoencapsulada pode justificar a redução da resposta sobre o metabolismo glicêmico quando comparado à droga livre.

Não se observou alteração dos marcadores de lesão renal e hepática, reforçando resultados de estudos anteriores que indicaram que o efeito antioxidante da capsaicina pode ser considerado fator protetor para o sistema renal (SHIMEDA et al., 2005). Interessantemente, os resultados, com exceção dos testes de uréia, possuem valores diferentes dos relatados pelo controle externo (BRANCO et al., 2011).

Pelos resultados observados conclui-se que a capsaicina, mesmo em doses muito superiores a  $DL_{50}$  por via i.p. não causou alteração da maioria dos parâmetros bioquímicos avaliados em comparação aos controles internos (NV e veículo). A maior taxa de glicemia do grupo interno (NV, CL e NC) comparada com o controle externo (LTF-UFPB) pode ser justificada por vários fatores como, por exemplo, linhagem genética, estresse, tipo da ração disponibilizada, pois os animais se alimentavam a vontade e, até mesmo, a diferença de tempo entre a última alimentação e o momento da coleta. Portanto, como a glicemia sofre maior influência de fatores externos, *e.g.* alimentação e estresse, comparado aos outros parâmetros analisados, já se esperava a possibilidade de diferença dos valores. A fim de desvendar possíveis mecanismos fisiológicos que alteraram a glicemia seria interessante mensurar, em análises futuras, os níveis de insulina, glucagon, adrenalina e até mesmo corticóides dos grupos experimentais.

GRÁFICO 9. VALORES DOS EXAMES BIOQUÍMICOS REPRESENTADOS EM MÉDIA  $\pm$  DP.

Fonte: Os valores de LTF-UFPB foram adaptados de Branco et al. (2011)

Nota: NV (nanopartícula vazia), CL (capsaicina livre), NC (nanopartícula de capsaicina), LFT-UFPB (Biotério - UFPB). Controle negativo interno e externo representados por NV e LTF-UFPB, respectivamente.

Além dos exames bioquímicos, o hemograma completo também foi avaliado utilizando os parâmetros do LTF-UFPB (BRANCO et al., 2011) como controle negativo externo e a NV como controle negativo interno (GRÁFICO 10). Diferentemente dos valores bioquímicos, os hematológicos foram similares aos do controle externo, principalmente no GRÁFICO 10, A e B.

Os resultados observados de hemoglobina total (HGB), glóbulos vermelhos (GV), volumar globular médio (VGM), hemoglobina corpuscular média (MCH) e concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) avaliaram a contagem de hemácias e índices hematimétricos. Com isso, é possível obter o tamanho da hemácia, o conteúdo de hemoglobina e auxiliar no diagnóstico e classificação de possíveis anemias, policitemias,

hemorragia e até mesmo desidratação. Não se observou diferença estatística entre os grupos experimentais e os controles interno e externo, com ausência de anormalidades hematológicas. Este resultado corrobora o observado pelo extrato de *Capsicum baccatum*, que também não apresentou alterações (ZIMMER et al., 2012).

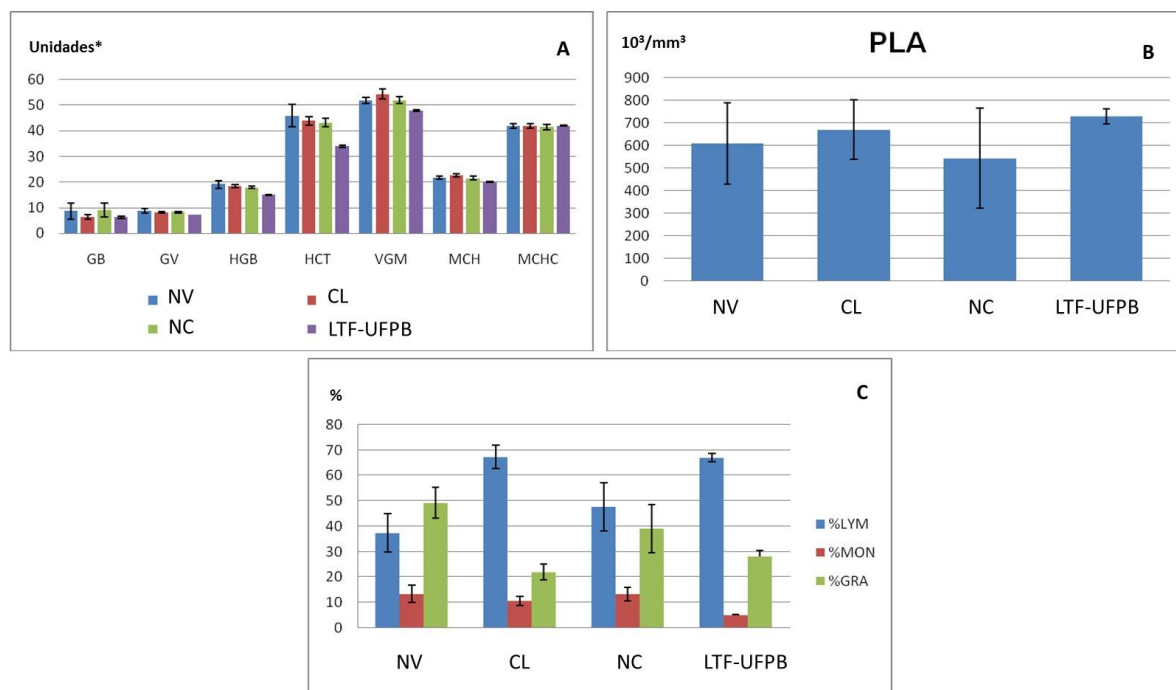
A contagem de plaquetas (GRÁFICO 10, B) é um importante teste de rastreamento da função plaquetária. Ela avalia a produção ou utilização de plaquetas, o que auxilia o diagnóstico e/ou prevenção de hemorragias e trombocitopenia. Os exames confirmaram a ausência de anormalidades.

A contagem de leucócitos (GB, GRÁFICO 10, A) e o exame diferencial (% granulócito, linfócitos e monócitos, GRÁFICO 10, C) avaliam a capacidade imunológica e a gravidade de possíveis infecções, detectam quadros de leucemia e a gravidade de reações alérgicas (contagem de eosinófilos) e processos inflamatórios. Estudos anteriores relatam que a capsaicina possui potencial de reduzir leucócitos, entretanto, estes estudos foram realizados apenas sob influência de fatores pró-inflamatórios. (SCHNEIDER et al., 2009). Ao analisar os resultados é possível detectar que a capsaicina livre promoveu elevação na % de linfócito (%LYM) e redução de granulócito (%GRA) em comparação com NV, valor também observado na contagem dos linfócito e granulócito. Esta diferença sobre linfócito e granulócitos foi mais proeminente no grupo CL quando comparado ao NC e, pode ser explicado pela liberação lenta da droga pelo polímero.

Aumento na porcentagem de linfócitos pode ser devido a várias causas, por exemplo, infecção bacteriana crônica, infecção viral (e.g. sarampo), leucemia linfocítica, múltiplo mieloma e hepatite infecciosa. Por outro lado, a redução dos basófilos pode indicar infecção aguda, câncer e injúria severa (VAJPAYEE et al., 2011). A investigação histológica possibilita avaliar qualquer possível dano aos órgãos selecionados e, com isso, buscar relacionar com esta alteração observada no hemograma.



GRÁFICO 10. VALORES MÉDIOS COM DP PARA OS EXAMES HEMATOLÓGICOS DIVIDIDOS EM 3 GRÁFICOS: A. GB, GV, HGB, HCT, VGM, MCH E MCHC; B. PLA; C. % DE LYM, MON E GRA.



Fonte: Os valores de LTF-UFPB foram adaptados de Branco et al. (2011).

Notas: Hemoglobina total (HGB), glóbulos vermelhos (GV), glóbulos brancos (GB), volume globular médio (VGM), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) e plaquetas (PLA). As unidades do Gráfico A foram VGM (mm³), HCT (%), HGB (g/dL), GV (milhões/mm³), GB (mil/mm³), MCH (pg) e MCHC (g/dl).

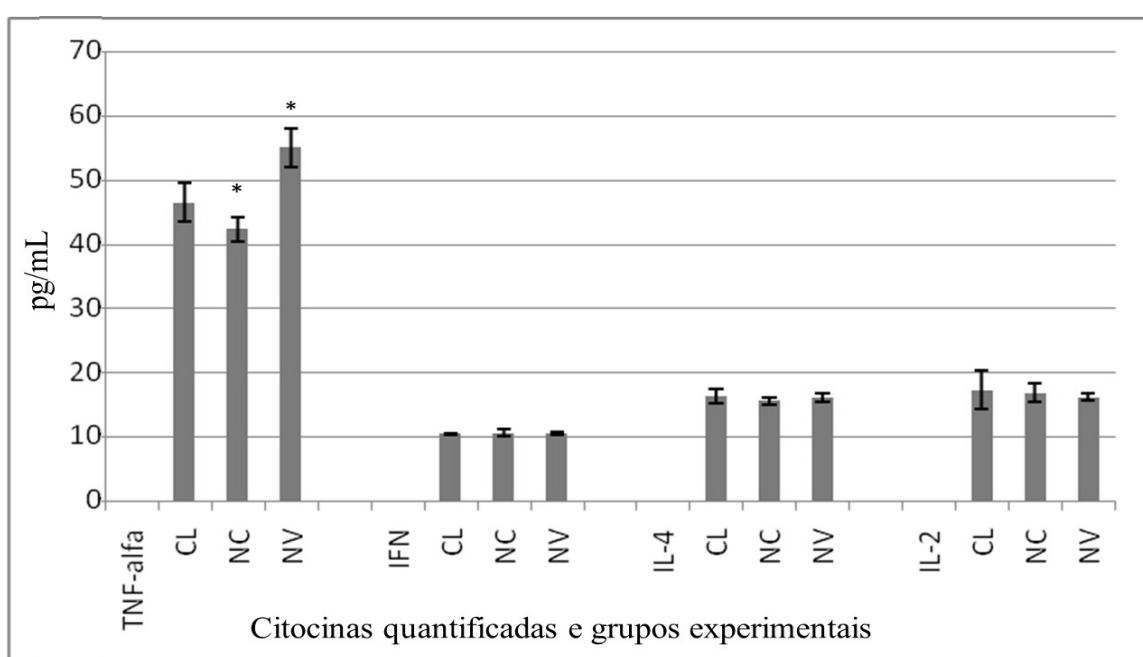
#### 4.5.2 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO SANGUE

Citocinas, como mencionado na introdução, são moléculas heterogêneas, tendo ações complementares e muitas vezes duais. Existem citocinas que podem ser consideradas como pró-inflamatórias, pois aumentam as diferentes etapas da resposta imunológica, *e.g.* IL-1, -2, -6, -9, -12, -14, -15, -16, -17, -18, -20, TNF-*alfa* e IFN-*alfa* ou ainda anti-inflamatórias (IL-10, IL-13, IL-19). Outras citocinas atuam preferencialmente na maturação de células, por exemplo, IL-3, -7, -9 e -11. Por outro lado, IL-4, -5, -6 atuam na defesa contra parasitas tendo também importância nas reações alérgicas.

A quantificação das citocinas pró-inflamatórias (TNF-*alfa*, IL-2, IL4 e IFN) tem como objetivo avaliar um possível mecanismo modulador da capsaicina. O grupo NV foi utilizado como controle negativo por não demonstrar alteração da resposta imunológica em comparação ao grupo veículo.

Observou-se que não houve alteração nos valores das citocinas IL-2, -4 e IFN quando comparada com o grupo controle negativo (GRÁFICO 11). Este resultado contrasta com alguns estudos anteriores que observaram efeito modulador da capsaicina sobre estas citocinas, elevando-as (TAKANO et al., 2007) ou suprimindo-as de maneira dose dependente (GERTSCH et al., 2002; FISCHER et al., 2001; SANCHO et al., 2002). A diferença metodológica entre os experimentos pode explicar tal variação, visto que, a maioria utiliza a capsaicina em modelo pró-inflamatório.

GRÁFICO 11. VALORES MÉDIOS DAS CITOCINAS TNF-*ALFA*, IFN, IL-4 E IL-2 PARA OS GRUPOS CL, NC E NV.



Notas: TNF-*alfa*: fator *alfa* de necrose tumoral; IFN: interferon *gamma* ; IL-4: interleucina-4; IL-2: interleucina-2. Os grupos NC e NV apresentaram diferença significativa na quantificação do TNF-*alfa* ( $p < 0,05$ ). NV (nanopartícula vazia), CL (capsaicina livre) e NC (nanopartícula de capsaicina).

Ao analisar os resultados da citometria do TNF-*alfa*, constatou-se que os grupos experimentais que receberam a droga livre e nanoencapsulada apresentaram menor expressão desta citocina. Este resultado corrobora relatos anteriores que descreveram ação inibitória da expressão do TNF-*alfa* sob situações de estímulos inflamatórios por LPS (IJIRI et al., 2014; PARK et al., 2004; VERGARA et al., 2006). Entretanto, o presente estudo apresenta o primeiro resultado de modelo *in vivo* sem que o animal tenha recebido um estímulo pró-inflamatório (por exemplo, LPS) antes da administração da capsaicina. Portanto, conclui-se que a resposta inibitória sobre TNF-*alfa* é independente deste prévio estímulo, porém o mecanismo ainda necessita maiores estudos para ser desvendado.

Como esta citocina possui duas características marcantes e contraditórias, isto é, pode gerar apoptose e necrose (potencial antitumoral) através da ativação dos "domínios da morte" (VAN HORSSSEN et al., 2006), como também pode estimular a proliferação, sobrevivência, migração e angiogênese resultando em promoção do tumor, estudos adicionais com modelos tumorais *in vivo* são necessários para concluir qual resposta biológica será gerada. O modelo de membrana corioalantóica em embrião de galinha poderá auxiliar na resposta sobre a angiogênese da droga livre e nanoencapsulada.

#### 4.5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA TOXICIDADE

Alguns estudos com modelos animais demonstram que a capsaicina possui potencial histoprotetor, pois é capaz de reduzir danos causados por agentes químicos ou físicos à diversos órgãos (HASSAN et al., 2012 PRIOR et al., 1990). No entanto, outros trabalhos mostram aumento da lesão em determinados órgãos, por exemplo fígado e pulmão (AGRAWAL; BHADE, 1987; AGRAWAL; BHADE, 1988; MURALIDHARA; NARASIMHAMURTHY, 1988). Com isso, buscou-se avaliar histologicamente órgãos que possam ser afetados com a administração intraperitoneal da capsaicina em alta concentração, *i.e.* pulmão, coração, rins, testículo, fígado e baço.

O procedimento para retirada dos órgãos selecionados para o estudo foi realizada pela incisão com bisturi no tórax dos ratos, seguida da abertura total da extensão tórax-abdominal e descolamento lateral do tecido para facilitar o processo (tópico 3.4.3, FIGURA 12). Os órgãos retirados foram prontamente acondicionados em recipientes com formol e levados ao laboratório de análise histológica.

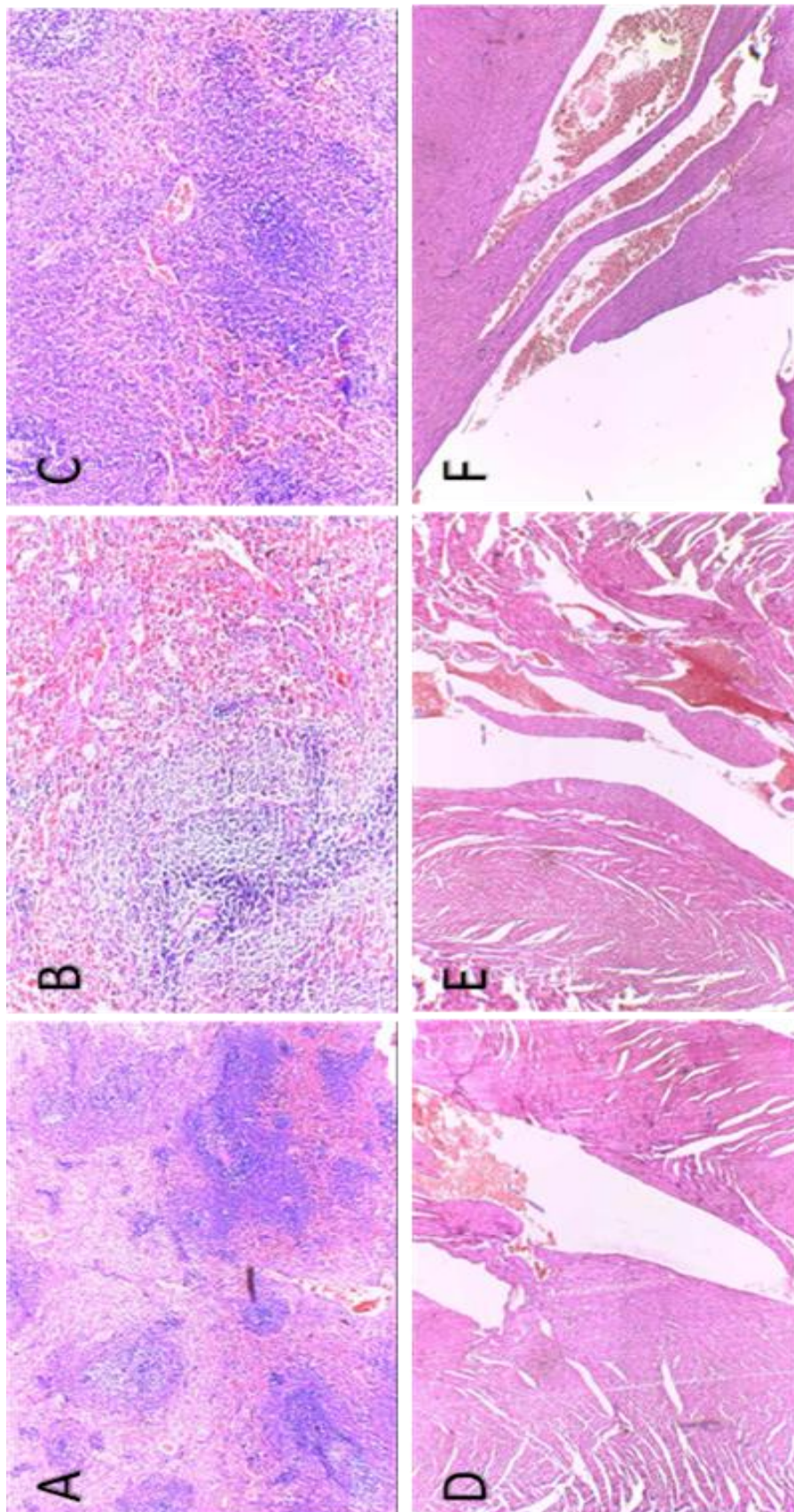
Os resultados do grupo controle (apenas veículo) e da nanopartícula de albumina vazia (NV) foram idênticos, portanto, serão apresentados como um único grupo, NV. A avaliação histológica do baço mostrou para os três grupos, NV, CL e NC a arquitetura preservada (FIGURA 21, A, B e C). A polpa branca é formada por tecido linfóide denso que fornece a trama de sustentação dos vasos sanguíneos. Ele é constituído por fibras reticulares mesenquimais, linfoblastos, linfócitos e plasmócitos. A polpa vermelha é constituída por tecido linfóide frouxo e capilares sinusóides congestos. Segundo as análises, nenhum tipo de alteração foi observada no tecido, mantendo-se integro e sem indício de atividade necro-inflamatória.

O corte histológico da câmara cardíaca ventricular (FIGURA 21, D, E e F) não apresentou indícios de necrose ou processo inflamatório, com parede miocárdica e fibras musculares preservadas. O estudo de Wang e colaboradores (2014) indicou um efeito protetor da capsaicina sobre formação de fibrose e hipertrofia do miocárdio, provavelmente via receptor TRPV-1. Portanto, além de não causar danos histológicos, a capsaicina ainda pode fornecer respostas cardio-protetoras, porém, devido a ausência de modelos positivos, não podemos afirmar isso apenas com os dados obtidos.

Os cortes histológicos do tecido hepático (FIGURA 22, A, B e C) dos três grupos não apresentaram atividade necro-inflamatória ou fibrose. No grupo CL observa-se cordões de hepatócitos em arranjo radial e, entre eles, encontram-se sinusóides. Nota-se centralmente espaço porta com vênula, arteríola e ducto biliar. Nos grupos NC e NV os hepatócitos estão dispostos em traves mais ou menos regulares.

A análise do tecido pulmonar (FIGURA 22, D, E e F) apresentou diferença entre os 3 grupos. O corte histológico do grupo com NV demonstrou bronquíolo terminal e respiratório com células cúbicas, algumas com cílios e lâmina própria de tecido conjuntivo circundada por células musculares lisas. O corte demonstra alvéolos distendidos com pneumócitos planos. Por outro lado, o exame histológico do grupo com capsaicina livre apresentou infiltrado inflamatório linfocitário em grau moderado, predominantemente linfócito adjacente do bronquíolo terminal, por vezes constituindo agregados linfóides. Observou-se também hiperplasia de pneumócitos multifocalmente, associada a congestão e focos de extravasamento recente de hemácias. As células pulmonares avaliadas no grupo de nanopartículas de capsaicina apresentou espessamento fibroso, edema (nos septos alveolares) e esparsas células inflamatórias, representadas por linfócitos e plasmócitos. Comparado ao grupo da droga livre, a droga nanoencapsulada demonstrou menor lesão sobre o tecido e discreto infiltrado inflamatório intersticial em septos alveolares reforçando a proteção ocasionada pelo polímero.

FIGURA 21. LÂMINAS HISTOLÓGICAS DO BAÇO: (A) CL, (B) NV, (C) NC E MIOCÁRDIO: (D) CL, (E) NV, (F) NC.



Este resultado reforça o efeito citotóxico que os capsaicinóides apresentam sobre células pulmonares. Estudos anteriores forneceram evidência de inflamação respiratória aguda e danos sobre células epiteliais. Acredita-se que este mecanismo leve a morte celular pela expressão de citocinas inflamatórias dependentes de cálcio, mecanismo iniciado pela interação com os receptores TRPV1 (REILLY et al., 2003). A justificativa destas citocinas não serem detectadas pela citometria no plasma é que a expressão ocorre de forma localizada, inicialmente apenas no epitélio das células pulmonares.

A vista panorâmica renal do grupo CL, demonstrou camada cortical com corpúsculos de Malpighi em número adequado e túbulos contorcidos. As camadas medulares externa e interna apresentam ductos coletores. Ausência de alterações nos túbulos intersticiais. Os outros dois grupos (NV e NC) também apresentaram normalidade do tecido, com tamanho, forma e celularidade conservados (FIGURA 23, A, B e C). O corte histológico do testículo (FIGURA 23, D, E e F) demonstra túbulos seminíferos revestidos por 4 a 8 camadas de células espermatogênicas e células de Sertoli. Um tecido conjuntivo frouxo circunda os túbulos seminíferos e abriga as células intersticiais (de Leydig). No lúmen, observam-se os flagelos espermáticos íntegros. Apesar da lâmina com NV apresentar uma imagem diferenciada do interstício, isso é considerado apenas um artefato, com isso, as análises comprovam a inexistência de qualquer dano ao tecido.



FIGURA 22. LÂMINAS HISTOLÓGICAS DE TECIDO HEPÁTICO: CL (A), NC (B), NV (C) E PULMONAR: CL (D), NV (E) E NC (F).

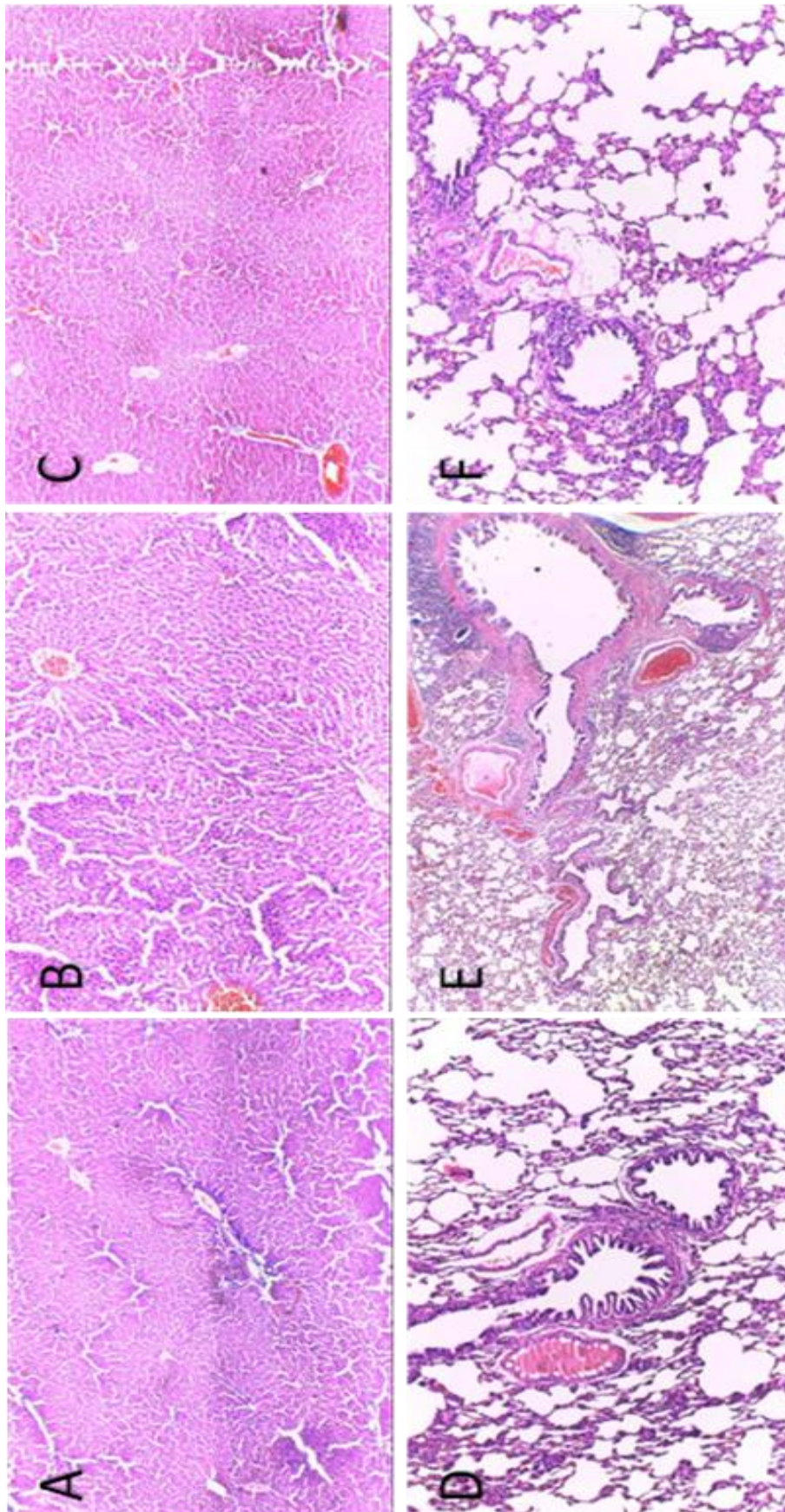
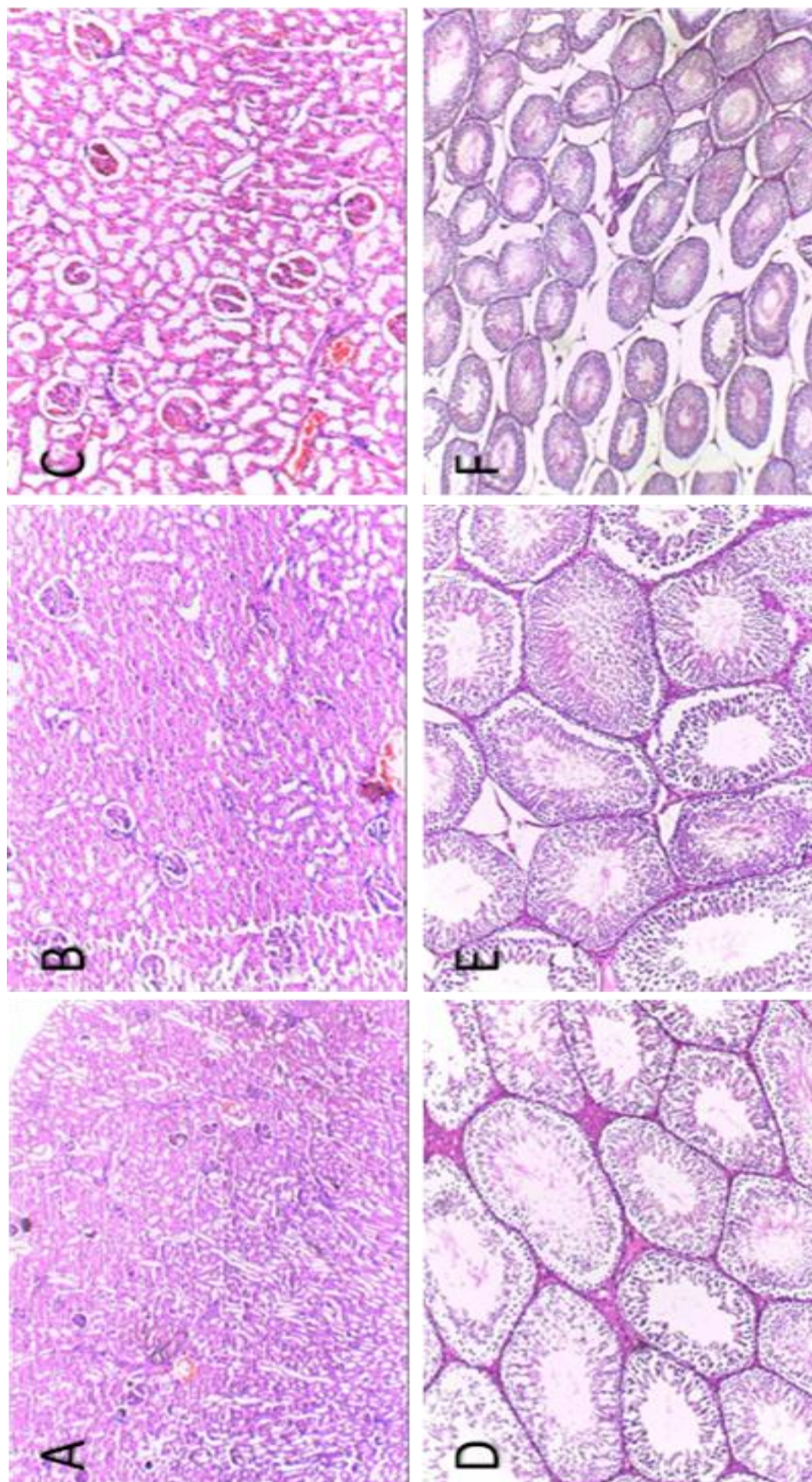




FIGURA 23. LÂMINAS DOS EXAMES HISTOLÓGICOS DE RINS: CL (A), NC (B), NV (C) E TESTÍCULO: CL (D), NC (E) E NV (F).



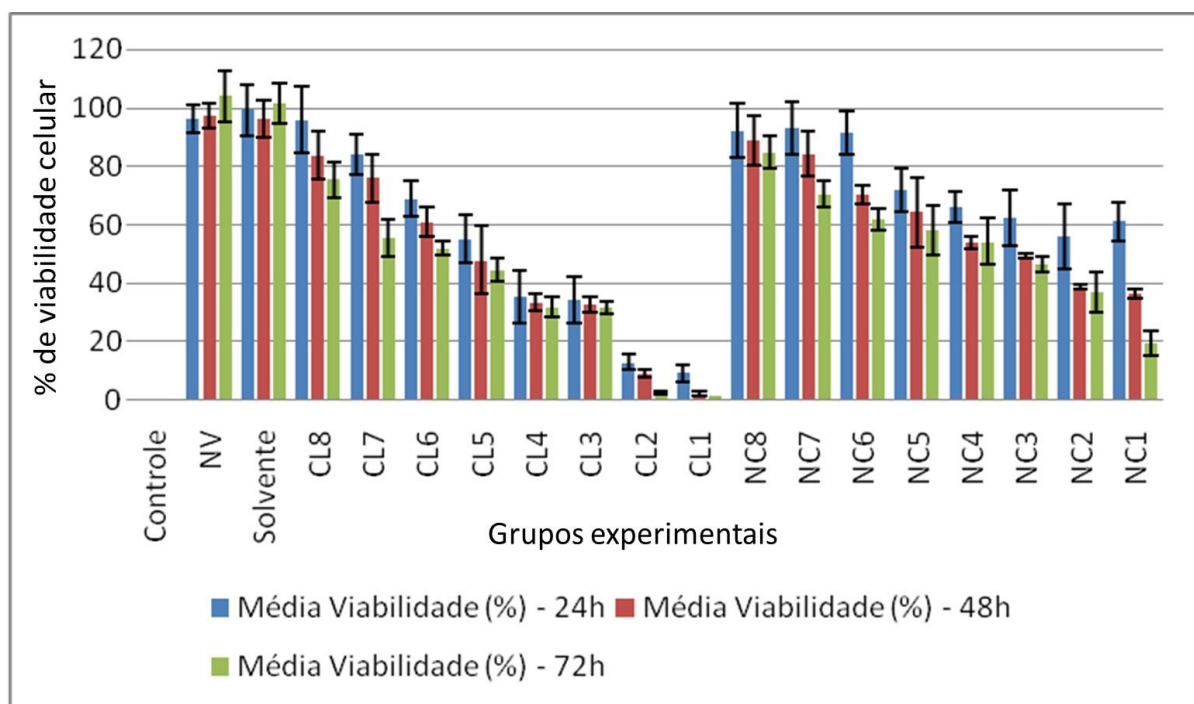


#### 4.6 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

Oito concentrações diferentes, isto é, 250 (1); 125 (2); 62,5 (3); 31,25 (4); 15,62 (5); 7,81 (6); 3,90 (7); 1,95 (8) ug/mL, de CL e NC, além do veículo, NV e controle negativo foram avaliadas através da incubação com células B16F10, modelo celular de melanoma.

O resultado da resposta média antitumoral *in vitro* com a capsaicina mostrou-se promissor, tanto com a droga livre quanto nanoencapsulada (GRÁFICO 12). Os resultados experimentais foram comparados com os observados no controle. É possível destacar que a droga livre apresentou efeito citotóxico maior do que a nanopartícula ( $p > 0,03$ ), resultado já esperado devido ao maior tempo necessário para liberação da droga dentro do polímero. Esta diferença provavelmente poderia ser anulada caso as concentrações dentro da NC fossem maiores em comparação a droga livre, o que forneceria uma resposta aguda mais intensa (dose-dependente). Porém, ao avaliar, por exemplo, CL3 com NC2, não houve diferença ( $p < 0,05$ ), o que demonstra que a elevação da concentração de CAP nas nanopartículas resolveria realmente a diferença de resposta.

GRÁFICO 12. RESULTADO DO TESTE DE VIABILIDADE DAS CÉLULAS B16F10 MENSURADA EM TRÊS TEMPOS (24, 48 E 72h)



Notas: Controle: controle negativo - apenas o meio de cultura; NV: nanopartícula vazia; Solvente: solução de PBS com etanol 5%. As concentrações de droga livre (CL) e nanoencapsulada (NC)

seguem as numerações: 250 (1); 125 (2); 62,5 (3); 31,25 (4); 15,62 (5); 7,81 (6); 3,90 (7); 1,95 (8) ug/mL

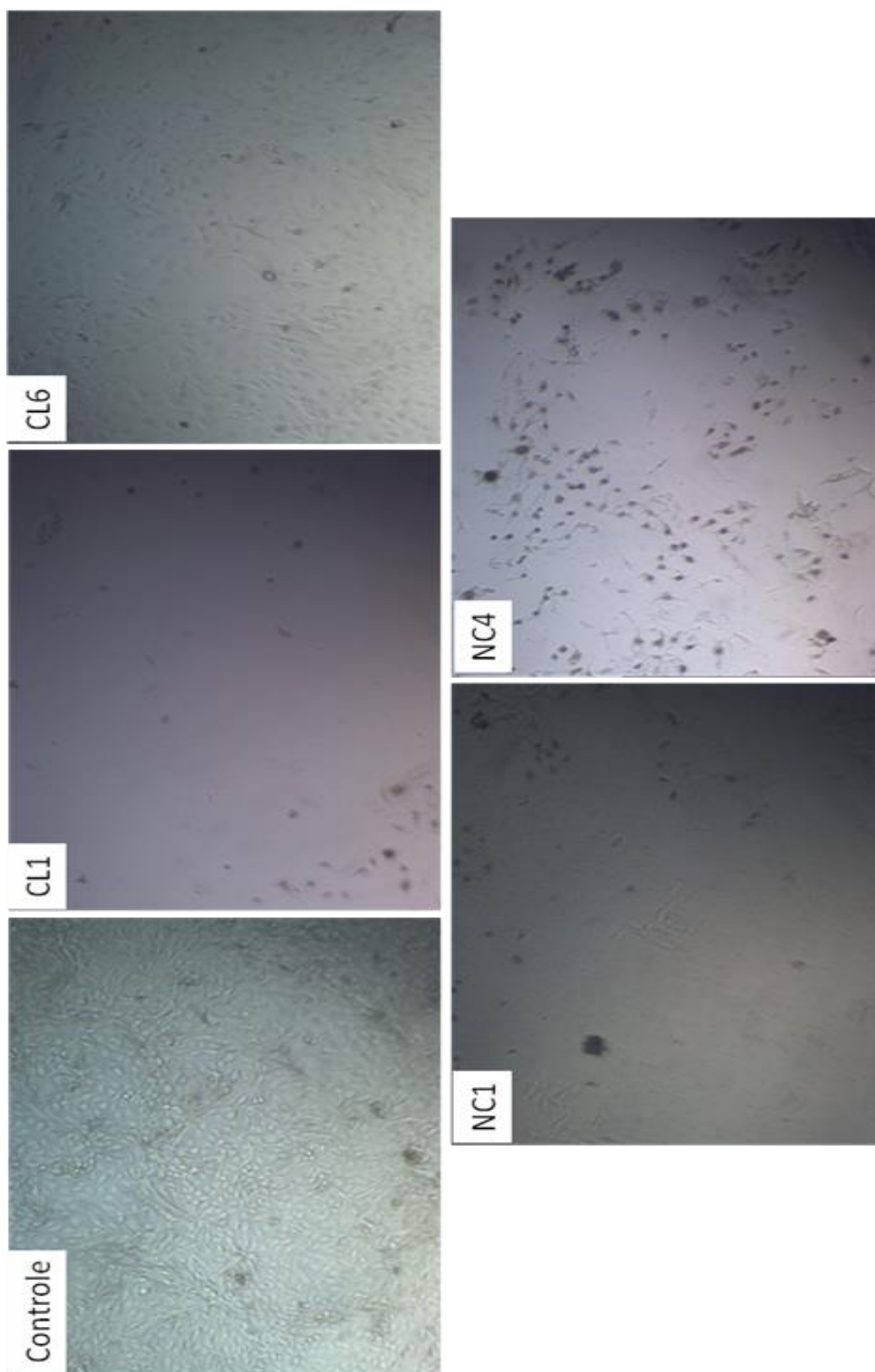
A capsaicina livre alcançou  $IC_{50}$  com as concentrações de 7,81 ug/mL (CL6) em 72h e 15,62 ug/mL (CL5) nas avaliações de 24 e 48h. Já a nanopartícula necessitou estar mais concentrada, 31,25 (NC4), 62,5 (NC3) e 125 (NC2) ug/mL em 72h, 48h e 24h, respectivamente, para alcançar a  $IC_{50}$ , reafirmando o perfil de resposta dose-tempo dependente esperado para nanocápsulas.

Na concentração de 250 ug/mL, praticamente não há viabilidade celular para a droga livre em 72h, enquanto que a capsaicina nanoencapsulada apresentou excelente perfil de resposta, com apenas 80,68% de células tumorais integras.

A análise microscópica (FIGURA 24) das células reforça de forma qualitativa os promissores resultados obtidos com a droga. A figura destaca a grande quantidade de células no controle negativo e o efeito citotóxico ocasionado pela capsaicina na forma livre e NC nas maiores concentrações testadas, CL1 e NC1, respectivamente (250 ug/mL). Os resultados das concentrações que caracterizaram os valores de  $IC_{50}$  também podem ser observados.

Estes resultados reforçam estudos anteriores sobre o potencial citotóxico da capsaicina e ainda caracterizam as nanopartículas de albumina como uma promissora formulação com atividade antitumoral.

FIGURA 24. RESULTADO MICROSCÓPICO DOS TESTES DE VIABILIDADE CELULAR.



Notas: Controle: controle negativo - apenas o meio de cultura; As concentrações de droga livre (CL) e nanoencapsulada (NC) seguem as numerações: CL1: 250; CL6: 7,81; NC1: 250; NC4: 31,25 ug/mL.

## 5 CONCLUSÃO

A etapa analítica para identificação e quantificação da capsaicina livre foi realizada com sucesso por cromatografia líquida de alta eficiência. Detectou-se que a amostra de capsaicina proveniente da empresa Galena® possuía pureza não menor do que 94%. Após, a avaliação de três fases móveis água:metanol, acetonitrila:água e metanol:acetonitrila, a fase água:metanol foi selecionada a proporção 85:15 (v:v) devido a presença de pico uniforme e separação adequada entre a capsaicina e dihidrocapsaicina no cromatograma. O método apresentou linearidade, robustez, seletividade, exatidão, precisão e adequada sensibilidade. A padronização analítica para quantificação da capsaicina foi fundamental durante as etapas de liberação *in vitro*, %EE e estabilidade das nanopartículas.

A síntese das nanopartículas de BSA com capsaicina pelo método de coacervação foi realizado com sucesso obtendo polímeros com a forma *quasi*-esférica, diâmetro médio de 205 nm, IP de 0,037 e %EE 98,3  $\pm$  7,4 (DPR). Estas características estão dentro das planejadas desde o início do trabalho para que ocorra menor opsonização e distribuição adequada para áreas tumorais. A síntese das nanopartículas teve pouca influência da variação de pH do meio entre 7 e 9, por isso, ao pensar em *scaling up* da formulação, a viabilidade se torna maior ao empregar um meio reacional sem a necessidade de solução tampão, ou seja, a solução com pH igual a 7 foi selecionada (Formulação 1). Observou-se também que glutaraldeído 8% e a velocidade de adição da solução etanol-capsaicina em 1mL/min ao meio aquoso do polímero, apresentaram as características desejadas e alta reprodutibilidade, sendo os parâmetros selecionados para desenvolvimento de novas nanopartículas de BSA, vazias e com capsaicina. A estabilidade da formulação foi avaliada por DLS. O método confirmou que as nanopartículas se mantinham estáveis por até 12 semanas à temperatura ambiente e refrigerada e, 9 semanas sob congelamento. Infelizmente não foi possível liofilizar as amostras devido a agregação dos polímeros durante o processo, o que gerou estruturas micrométricas.

As caracterizações físico-químicas e microscópica demonstraram que a capsaicina realmente estava associada ao polímero com estrutura de nanocápsula. A cinética de liberação do fármaco foi calculada durante 72h e demonstrou um perfil bifásico. A curva do gráfico confirmou liberação rápida de 8  $\pm$  2 e 27 $\pm$ 3% em 1/2 e 24 horas, respectivamente, seguindo a partir deste ponto um perfil mais lento com 45 $\pm$ 2% ao final de 72h.

A capsaicina demonstrou na forma livre um perfil de atividade antioxidante dose-dependente com ~97% de redução do cátion radical ABTS na concentração de 98  $\mu$ g/mL.

Além do perfil de resposta dependente da dose, as nanopartículas também apresentaram resposta tempo-dependente, o que confirma a liberação constante da droga, característica esperada com a formulação de nanocápsulas.

Ademais, as avaliações *in vivo* sobre possíveis toxicidades e alterações sobre parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos forneceram dados que evidenciam o potencial de segurança da formulação, mesmo em doses bem superiores da DL<sub>50</sub>. A segurança sobre tecidos saudáveis um dos principais requisitos no desenvolvimento de um novo fármaco antitumoral.

Constatou-se que a capsaicina administrada de forma aguda não causou alterações sobre os parâmetros de IL-2, IL-4 e IFN, porém, reduziu a quantidade de TNF-*alfa* no sangue. A nanopartícula causou menor redução, resultado já esperado devido à cinética de liberação.

O potencial antitumoral foi confirmado sobre a linhagem de células tumorais B16F10. Ambos, droga livre e nanoencapsulada tiveram excelente resultado em 72h, confirmados pelos valores de IC<sub>50</sub> de 7,81 e 31,25 ug/mL, respectivamente.

A nanopartícula de capsaicina é um produto final inovador, validado e reproduzível, o qual já foi depositado no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) através do pedido de patente, Anexo I.

Como perspectiva para continuação do estudo deve ser ressaltada a necessidade de avaliar o efeito antitumoral sobre modelos *in vivo* e a farmacocinética pré-clínica a fim de definir o tempo de resposta clínica, regime terapêutico e se a formulação realmente poderá ser considerada um protótipo. Além disso, modelos *in vitro* com doseamento por citometria de fluxo marcadores celulares de morte celular seria a continuidade do estudo sobre o possível mecanismo antitumoral da capsaicina. Segundo estudos anteriores, a capsaicina livre apresentou atividade anti angiogênica em modelos *in vitro*, o que poderá ser investigado a consistência do resultado na forma de nanocápsulas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI S, PAUL A, SHAO W, et al. Cationic albumin nanoparticles for enhanced drug delivery to treat breast cancer: preparation and *in vitro* assessment. *J Drug Deliv*. 2012; 2012: 1-8.
- ABDELWAHEDA W, DEGOBERTA G, STAINMESSEB S, et al. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006; 58: 1688–713.
- AGNELLO D, LANKFORD CS, BREM J, et al. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol*. 2003; 23:147–61.
- AGRAWAL RC, WIESSLER M, HECKER E, et al. Tumour-promoting effect of chilli extract in BALB/c mice. *Int J Cancer*. 1986; 38: 689-95.
- AGRAWAL RC, BHIDE SV. Histopathological studies on toxicity of Chilli (Capsaicin) in Syrian golden hamsters. *Indian J Experim Biol*. 1988; 26: 377-82.
- AGRAWAL RC, BHIDE SV. Biological studies on carcinogenicity of chillies in balb/c mice. *Indian J Med Res*. 1987; 86: 391-6.
- AGRAWAL U, GUPTA M, VYAS SP. Capsaicin delivery into the skin with lipidic nanoparticles for the treatment of psoriasis. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2015; 43: 33-9.
- ALLEN TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 750-63.
- ALLEONI ACC. Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. *Sci. Agric*. 2006; 63: 291-8.
- ALLISON M. Reinventing clinical trials. *Nat Biotechnol*. 2012; 30: 41–49.
- AL OTHMAN ZA, AHMED YBH, HABILA MA, et al. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in capsicum fruit samples using high performance liquid chromatography. *Molecules*. 2011; 16: 8919-29
- ALTEKRUSE SF, KOSARY CL, KRAPCHO M, et al (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2007/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/), acessado em 05 de outubro de 2015.
- AMANTINI C, MOSCA M, NABISSI M, et al. Capsaicin-induced Apoptosis of Glioma Cells is Mediated by TRPV1 Vanilloid Receptor and Requires p38 MAPK Activation. *J Neurochem*. 2007; 102: 977-90.
- AMIJI MM. Nanotechnol Cancer therapy. PATRI A, DOBROVOLSKAIA M, STERN S, et al. Preclinical characterization of engineered nanoparticles intended for cancer therapeutics. Cap. 7,ed. CRC Press. 2007.

AMRUTHRAJ NJ, RAJ JPP, LEBEL A. Capsaicin-capped silver nanoparticles: its kinetics, characterization and biocompatibility assay. *Appl Nanosci*. 2015; 5: 403–09.

ANAND BG, DUBEY K, SHEKHAWAT DS, et al. Capsaicin-coated silver nanoparticles inhibit amyloid fibril formation of serum albumin. *Biochem*. 2016; 55: 3345-87.

ANCHO R, LUCENA C, MACHO A, et al. Immunosuppressive activity of capsaicinoids: capsiate derived from sweet peppers inhibits NF-kappa B activation and is a potent antiinflammatory compound *in vivo*. *Eur J Immunol*. 2002; 32: 1753–63.

ANHORN MG, MAHLER HC, LANGER K. Freeze drying of human serum albumin (HSA) nanoparticles with different excipients. *Int J Pharm*. 2008; 363: 162-9.

ANTONY GK; DUDEK AZ. Interleukin 2 in Cancer Therapy. *Cur Med Chem*. 2010; 17: 3297-302.

ANDERSON RA, THEMMEN APN, AL-QAHTANI A, et al. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer *Hum. Reprod*. 2006; 21: 2583-92.

ARCHER VE, JONES DW. Capsaicin pepper, cancer and ethnicity. *Med Hypotheses*. 2002; 59: 450-7.

ARNON J, MEIROW D, LEWIS-RONESS H, et al. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Hum Reprod Update*. 2001; 7: 394-403.

ASHTON ACTON. Scholarly Edition, Atlanta, Georgia. *Drug Carriers—Advances in Research and Application*: 2012, Capítulo 2, 396.

AVADI MR, SADEGHI AMM, MOHAMMADPOUR N, et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*. 2010; 6: 58–63.

BAKER ME. Beyond carrier proteins. albumin, steroid hormones and the origin of vertebrates.. *J Endocrinol*. 2002; 175: 121–7.

BANO D, YOUNG KW, GUERIN CJ, et al. Cleavage of the Plasma Membrane Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger in Excitotoxicity. *Cell*. 2005; 20: 275-85.

BANSAL A, KAPOOR DN, KAPIL R, et al. Design and development of paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles for brain targeting. *Acta Pharm*. 2011, 61: 141–56.

BASMADJIAN C, ZHAO Q, BENTOUHAMI E, et al. Cancer wars: Natural products strike back. *Front Chem*. 2014; 2: 20-38.

BASU S; SRIVASTAVA P. Immunological role of neuronal receptor vanilloid receptor 1 expressed on dendritic cells. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2005; 102: 5120–5.

BEATTY G; PATERSON Y. IFN-gamma-dependent inhibition of tumor angiogenesis by tumorinfiltrating CD4<sup>+</sup> T cells requires tumor responsiveness to IFN-gamma. *J Immunol*. 2001; 166: 2276–82.

BEYER KU, Serum proteins as drug carriers of anticancer agents: a review. *Drug Deliv.* 1998; 5: 281–99.

BELLIZZI KM, MUSTIAN KM, PALESH OG, et al. Cancer survivorship and aging: moving the science forward. *Cancer.* 2008; 113: 3530–9.

BERBEROGLU U, YILDIRIM E, CELEN O. Serum levels of tumor necrosis factor alpha correlate with response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Int J Biol Markers.* 2004; 19: 130–4.

BHARALI DJ, KHALIL M, GURBUZ M, et al. Nanoparticles and cancer therapy: A concise review with emphasis on dendrimers. *Int J Nanomedicine.* 2009; 4: 1–7.

BIDB, U.S. Census Bureau International Data Base, 2011. <http://www.census.gov/ipc/www/idb/informationGateway.php>, acessado em 12 de junho de 2015.

BILLMIRE DF, VINOCUR C, GINDA M, et al. Pepper spray-induced respiratory failure treated with extracorporeal membrane oxygenation. *Pediatrics.* 1996; 98: 961–3.

BODE AM, DONG Z. The two faces of capsaicin. *Cancer Res.* 2011; 71: 2809-2014.

BOEHM U, KLAMP T, GROOT M, et al. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15: 749–95.

BOEHM O, ZUR B, KOCH A, et al. Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. *Biol Chem.* 2007; 388: 547-54.

BOOTZ A, VOGEL V, SCHUBERT D, et al. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004; 57: 369–75.

BOZZUTO G, MOLINARI A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine.* 2015; 10: 975–999.

BRANCO ACSC; DINIZ MFFM, ALMEIDA RN, et al. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos wistar e camundongos swiss do biotério professor Thomas George. *Rev Bras Ciências Saúde.* 2011; 15: 209-14.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Brasília, DF, 02 fev. 2003.

BRITO NM, JUNIOR OPA, POLESE L, et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: R Ecotoxicol Meio Ambiente.* 2003; 13: 129-46.

BRODY JR, COSTANTINO CL, BERGER AC, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival. *Cell Cycle.* 2009; 8: 1930–4.



BROWN KC, WITTE TR, HARDMAN WE, et al. Capsaicin displays anti-proliferative activity against human small cell lung cancer in cell culture and nude mice models via the E2F pathway. PLoS One. 2010; 5: e10243.

BUIATTI E, PALLI D, DECARLI A, et al. A case-control study of gastric cancer and diet in Italy. Int J Cancer. 1989; 44: 611-6.

BUSKER RW; VAN HELDEN HP. Toxicologic evaluation of pepper spray as a possible weapon for the Dutch police force: risk assessment and efficacy. Am J Forensic Med Pathol. 1998; 19: 309-16.

CANCER RESEARCH UK, Worldwide cancer statistics 2012. <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer>, acessado em 10 de outubro de 2015.

CAPRODOSSI S, AMANTINI C, NABISSI M, et al. Capsaicin promotes a more aggressive gene expression phenotype and invasiveness in null-TRPV1 urothelial cancer cells. Carcinogenesis. 2011; 32: 686-94.

CAO K, CHEN-PLOTKIN AS, PLOTKIN JB, et al. Age-Related gene expression in normal and neurodegenerative human brain tissues. PLoS One. 2010; 5: e13098.

CARBONI E, TSCHUDI K, NAM J, et al. Particle margination and its implications on intravenous anticancer drug delivery. AAPS Pharm Sci Tech. 2014; 15: 762-71.

CASPERSEN CJ, THOMAS GD, BOSEMAN LA, et al. Aging, diabetes, and the public health system in the United States. Am J Public Health. 2012; 102: 1482-97.

CERUTTI PA. Oxy-radicals and Cancer. Lancet. 1994; 344: 862-3.

CHAIYASIT K, KHOVIDHUNKIT W, WITTAYALERTPANYA S. Pharmacokinetic and the effect of capsaicin in *Capsicum frutescens* on decreasing plasma glucose level. J Med Assoc Thai. 2009; 92: 108-13

CHANDA S, EREXSON G, FROST D, et al. 26-Week dermal oncogenicity study evaluating pure trans-capsaicin in Tg.AC hemizygous mice (FBV/N). Int J Toxicol. 2007; 26: 123-33.

CHANTHAI S, JUANGSAMOOT J, RUANGVIRIYACHAI C, et al. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in some chilli varieties using accelerated solvent extraction associated with solid-phase extraction methods and RP-CLAE-Fluorescence. E-J Chem. 2012; 9: 1550-61. MUSFIROH I,

CHARLES RIVER LABORATORIES. 2008. Wistar rat hematology. [www.criver.com/sitecollectiondocuments/rm\\_rm\\_r\\_wistar\\_rat\\_hematology\\_2008.pdf](http://www.criver.com/sitecollectiondocuments/rm_rm_r_wistar_rat_hematology_2008.pdf). acessado em dezembro de 2014.

CHAWLA-SARKAR M, LINDNER DJ, LIU YF, et al. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. Apoptosis. 2003; 8: 237-49.

CHEN R, LOWE L, WILSON JD, et al. Simultaneous quantification of six human cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. Clin Chem. 1999; 45: 2693-4.

- CHIN YE, KITAGAWA M, SU WC, et al. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science*. 1996; 272: 719–22.
- CHOU CC, WU YC, WANG YF, et al. Capsaicin-induced apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through caspase-independent pathway. *Oncol Rep*. 2009; 21: 665-71.
- COLLINS MD, WASMUND LM, BOSLAND PW. Improved method for quantifying capsaicinoids in capsicum using high performance liquid chromatography. *Hortsci*. 1995; 30: 137–139.
- CONTRI RV, KAISER M, POLETTO FS, et al. Simultaneous control of capsaicinoids release from polymeric nanocapsules. *J Nanosci Nanotechnol*. 2011; 11: 2398-406.
- CONTRI RV, FRANK LA, KAISER M, et al. The use of nanoencapsulation to decrease human skin irritation caused by capsaicinoids. *Int J Nanomedicine*. 2014; 12: 951-62.
- CONTRI RV, KATZER T, OURIQUE AF, et al. Combined effect of polymeric nanocapsules and chitosan hydrogel on the increase of capsaicinoids adhesion to the skin surface. *J Biomed Nanotechnol*. 2014; 10: 820-30.
- COUGHLIN CM, SALHANY KE, GEE MS, et al. Tumor cell responses to IFN $\gamma$  affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity*. 1998; 9: 25–34.
- CROFTON PM, AHMED SF, WADE JC, et al. Effects of intensive chemotherapy on bone and collagen turnover and the growth hormone axis in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83: 3121-9.
- DADPARVAR M, WAGNER S, WIEN S, et al. Freeze-drying of HI-6-loaded recombinant human serum albumin nanoparticles for improved storage stability. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014; 88: 510-7.
- DHAKA A, UZZELL A, DUBIN A, et al. TRPV1 senses both acidic and basic pH. *J Neurosci*. 2009; 29: 153–8.
- DASGUPTA P, CHANDIRAMANI V, PARKINSON MC, et al. Treating the human bladder with capsaicin: is it safe? *Eur Urol*. 1998; 33: 28-31.
- DEAL CL, SCHNITZER TJ, LIPSTEIN E, et al. Treatment of arthritis with topical capsaicin: a double-blind trial. *Clin Ther*. 1991; 13: 383-95.
- DENMEADE SR, LIN XD, ISAACS JT. Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate*. 1996; 28: 251. DENIZOT F, LANG R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J Immunol Methods*. 1986; 89: 271-7.
- DESAGHER S; MARTINOU JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*. 2000; 10: 369-77.

DESAIA PR, MAREPALLYA S, PATELA AR, et al. Topical delivery of anti-TNF $\alpha$  siRNA and capsaicin via novel lipid-polymer hybrid nanoparticles efficiently inhibits skin inflammation in vivo. *J Control Release*. 2013; 170: 51–63.

DÍAZ-LAVIADA I. Effect of capsaicin on prostate cancer cells. *Future Oncol*. 2010; 6: 1545–50.

DIGHE AS, RICHARDS E, OLD LJ, et al. Enhanced *in vivo* growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*. 1994; 1: 447–56.

DI TULLIO MR, SACCO RL, SCIACCA RR, et al. Patent foramen ovale and the risk of ischemic stroke in a multiethnic population. *Am Coll Cardiol*. 2007; 49: 797–802.

DU J; TANG XL. Natural products against cancer: A comprehensive bibliometric study of the research projects, publications, patents and drugs. *J Can Res Ther*. 2014; 10: 27–37.

DUNN GP, KOEBEL CM, SCHREIBER RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6: 836–48.

EALICK SE, COOK WJ, VIJAY-KUMAR S, et al. Threedimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science*. 1991; 252: 698–702.

ECKER DM1, JONES SD, LEVINE HL. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs*. 2015; 7: 9–14.

ELGERSMA AV, ZSOM RLJ, NORDE W, et al. The Adsorption of Bovine Serum Albumin on Positively and Negatively Charged Polystyrene Latices. *J Colloid Interface Sci*. 1990; 138: 145–56

ELZOGHBY AO, SAMY WM, ELGINDY NA. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J Control Release* 2012; 157: 168–82.

European Commission Health; Consumer Protection Directorate-general. Opinion of the Scientific Committee on Food on Capsaicin. 28 February 2002. [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out120\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out120_en.pdf). Acessado em 28 de agosto de 2015.

FARIA MHG; PATROCÍNIO GMSV. Expressão das proteínas BCL-2 e BAX em tumores astrocíticos humanos. *Bras Patol Med Lab*. 2006; 42: 271–8.

FDA, Hematology/Oncology (Cancer) Approvals; Safety Notifications. 2016. <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm279174.htm>, acessado em 12 de marco de 2016.

FERRAJOLI A, KEATING MJ, MANSHOURI T, et al. The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002; 100: 1215–9.

FERRARI M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5: 161–71.

FISCHER BS, QIN D, KIM K, et al. Capsaicin inhibits Jurkat T-cell activation by blocking calcium entry current I (CRAC). *J Pharmacol Exp Therap.* 2001; 299: 238–46.

FLEEMAN N, BAGUST A, BOLAND A, et al. Lapatinib and trastuzumab in combination with an aromatase inhibitor for the first-line treatment of metastatic hormone receptor-positive breast cancer which over-expresses human epidermal growth factor 2 (HER2): a systematic review and economic analysis. *Health Technol Assess.* 2011; 15: 1-93.

FLORA SJS, ROMANO JA, BASKIN SI, ET AL. *Pharmacological Perspectives of Toxic Chemicals and Their Antidotes.* New Dheli, Narosa Publishing House, 2004.

FRIEDRICH P, LAM CG, ITRIAGO E, et al. Magnitude of treatment abandonment in childhood cancer. *PLoS One.* 2015; 10: e0135230.

FUKAO T, FRUCHT DM, YAP G, et al. Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses. *J Immunol.* 2001; 166: 4446–55.

FUKUMURA D, DUDA DG, MUNN LL, et al. Tumor microvasculature and microenvironment: novel insights through intravital imaging in pre-clinical models. *Microcirc.* 2010; 17: 206-25.

GALLO JM, HUNG CT, PERRIER DG. Analysis of albumin microsphere preparation. *Internat J Pharmac.* 1984; 22: 63-74

GERTSCH J, GUTTINGER M, STICHER O, et al. Relative quantification of mRNA levels in Jurkat T cells with RT-real time-PCR (RT-rt-PCR): new possibilities for the screening of anti-inflammatory and cytotoxic compounds. *Pharmaceut Res.* 2002; 19: 1236–43.

GESKIN LJ. Monoclonal Antibodies. *Dermatol Clin.* 2015; 33: 777-86.

GLINSUKON T, STITMUNNAITHUM V, TOSKULKAO C, et al. Acute toxicity of capsaicin in several animal species. *Toxicon.* 1980; 18: 215-20.

GONZALES CB, KIRMA NB2, DE LA CHAPA JJ, et al. Vanilloids induce oral cancer apoptosis independent of TRPV1. *Oral Oncol.* 2014; 50: 437–47.

GRAHAM DY, SMITH JL, OPEKUN AR. Spicy food and the stomach. Evaluation by videoendoscopy. *JAMA.* 1988; 260: 3473-5.

GRUNNET LG, AIKIN R, TONNESEN MF, et al. Proinflammatory cytokines activate the intrinsic apoptotic pathway in beta-cells. *Diabetes.* 2009; 58: 1807-15.

GUNTHORPE MJ, BENHAM CD, RANDALL A, et al. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci.* 2002; 23: 183-91.

GUO A, VULCHANOVA, L, WANG J, et al. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci.* 1999; 11: 946–58.

GUO C, CHEN HY, CUI BL, et al. Development of a HPLC method for the quantitative determination of capsaicin in collagen sponge. *Int J Analytical Chem.* 2015; article ID 912631: 1-6.

GUSTAFSON TP, DERGUNOV SA, AKERS AJ, et al. Blood triggered rapid release porous nanocapsules. *RSC Adv.* 2013; 3: 5547-55.

HALL JB, DOBROVOLSKAIA MA, PATRI AK, et al. Characterization of nanoparticles for therapeutics. *Nanomed.* 2007; 2: 789–803.

HARASHIMA H, SAKATA K, FUNATO K, et al. Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. *Pharm Res (N Y).* 1994; 11: 402–6.

HARRISON MA, RAE IF. General techniques of cell culture. New York: Cambridge University Press. p. 162, 1997.

HASSAN MH, EDFAWY M, MANSOUR A, et al. Antioxidant and antiapoptotic effects of capsaicin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicol Ind Health.* 2012; 28: 428-38.

HECK A. Accidental pepper spray discharge in an emergency department. *J Emerg Nurs.* 1995; 21: 486.

HERLYN M, GUERRY D, KOPROWSKI H. Recombinant gamma-interferon induces changes in expression and shedding of antigens associated with normal human melanocytes, nevus cells, and primary and metastatic melanoma cells. *J Immunol.* 1985; 134: 4226–30.

HOBEIKA AC, ETIENNE W, TORRES BA, et al. IFN-gamma induction of p21 (WAF1) is required for cell cycle inhibition and suppression of apoptosis. *J Interferon Cytokine Res.* 1999; 19: 1351–61.

HOCH-LIGETI C. Production of liver tumours by dietary means; effect of feeding chilies [*Capsicum frutescens* and *annuum* (Linn.)] to rats. *Acta Unio Int Contra Cancrum.* 1951; 7: 606-11.

HOCHREIN H, SHORTMAN K, VREMEC D, et al. Differential production of IL-12, IFN- $\alpha$ , and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol.* 2001; 166: 5448–55.

HOOPER et al. Hematological profiles of wistar rats at laboratory animal breeding center. Trabalho apresentado no X Congresso Brasileiro da Ciência de Animais de Laboratório, VI Congresso Mundial da Ciência de Animais de Laboratório, V Encontro de Pesquisadores do Mercosul. COBEA, São Paulo, 2007.

HOROBIN RW. How Romanowsky stains work and why they remain valuable - including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. *Biotech Histochem.* 2011; 86: 36-51.

HU X, CHAKRAVARTY SD, IVASHKIV LB. Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunol Rev.* 2008; 226: 41–56.

HORIBA. Zeta potential of bovine serum albumin (bsa) protein. Particle Characterization Analyzer AN184, Applications Note. 2009

HOYLE M, CRATHORNE L, PETERS J, et al. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of cetuximab (mono- or combination chemotherapy), bevacizumab (combination with non-oxaliplatin chemotherapy) and panitumumab (monotherapy) for the treatment of metastatic colorectal cancer after first-line chemotherapy (review of technology appraisal No.150 and part review of technology appraisal No. 118): a systematic review and economic model. *Health Technol Assess.* 2013; 17: 1-237.

HUANG P, LI Z, HU H, et al. Synthesis and Characterization of Bovine Serum Albumin-Conjugated Copper Sulfide Nanocomposites. *J Nanomaterials.* 2010; Article ID 641545, 6.

HWANG JT, PARK IJ, SHIN JI, et al. Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 338: 694-9.

ICH - International Conference on Harmonization; Q2R1- validation of Analytical procedure: Text and Methodology, 2005.

IJIRI Y, KATO R, SASAKI D, et al. The effect of capsaicin on circulating biomarkers, soluble tumor necrosis factor and soluble tumor necrosis factor-receptor-1 and -2 levels *in vivo* using lipopolysaccharide-treated mice. *Toxicol Reports.* 2014; 1: 1062–7.

IMOTO MN, FREITAS RJS. Determinação dos limites de detecção (ld) e quantificação (lq) em análise de resíduos de pesticidas organohalogenados por cromatografia em fase gasosa. *Pesticidas: R Ecotoxicol meio amb.* 2008; 18: 35-44.

INAI T, MANCUSO M, HASHIZUME H, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am J Pathol.* 2004; 165: 35-52.

INCA, Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. 2014. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>, acessado em 02 de abril de 2016.

IRMLER IM, GAJDA M, BRAUER R. Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN-gamma-deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response. *J Immunol.* 2007; 179: 6228–36.

ITO K, NAKAZATO T, YAMATO K, et al. Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: Implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Res.* 2004; 64: 1071–8.

IVERSON SL, HU LQ, VUKOMANOVIC V, et al. The influence of the p-alkyl substituent on the isomerization of o-quinones to p-quinone methides: potential bioactivation mechanism for catechols. *Chem Res Toxicol.* 1995; 8: 537-44.

JANG JJ, CHO KJ, LEE YS, et al. Different modifying responses of capsaicin in a wide-spectrum initiation model of F344 rat. *J Korean Med Sci.* 1991; 6: 31-6.

JAVADZADEH Y, AHADI F, DAVARAN S. et al. Preparation and physicochemical characterization of naproxen-PLGA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010; 81: 498-502.

JIANG Z, WANG X, ZHANG Y, et al. Effect of capsaicin-loading nanoparticles on gliomas. *J Nanosci Nanotechnol*. 2015; 15: 9834-9.

JIN HW, ICHIKAWA H, FUJITA M, et al. Involvement of caspase cascade in capsaicin-induced apoptosis of dorsal root ganglion neurons. *Brain Res*. 2005; 1056: 139-44.

JITHAN AV, MADHAVI K, MADHAVI M, et al. Preparation and characterization of albumin nanoparticles encapsulating curcumin intended for the treatment of breast cancer. *Int J Pharm Investig*. 2011; 1: 119-25.

JOE B, LOKESH BR. Prophylactic and therapeutic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids, capsaicin and curcumin in adjuvant induced arthritis. *J Nutr Biochem*. 1997; 8: 397-407.

JUANGSAMOOT J, RUANGVIRIYACHAI C, TECHAWONGSTIEN S, et al. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in some hot chilli varieties by RP-CLAE-PDA after magnetic stirring extraction and clean up with C18 cartridge. *Int Food Res J*. 2012; 19: 1217-26.

JUNGE W, WILKE B, HALABI A, et al. Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffé method. *Cinica Chimica Acta*, 2004; 344: 137-48.

JUNG B; ANVARI B. Synthesis and characterization of bovine serum albumin-coated nanocapsules loaded with indocyanine green as potential multifunctional nanoconstructs. *Biotechnol Progress*. 2012; 28: 533-9

KAPLAN DH, SHANKARAN V, DIGHE AS, et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 7556-61.

KARAI L, RUSSELL JT, IADAROLA MJ, et al. Vanilloid receptor 1 regulates multiple calcium compartments and contributes to  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release in sensory neurons. *J Biol Chem*. 2004; 279: 16377-87.

KASKIE B, OBRIZAN M, JONES MP, et al. Older adults who persistently present to the emergency department with severe, non-severe, and indeterminate episode patterns. *BMC Geriatr*. 2011; 11: 65-75.

KATZ JB, MULLER AJ, PRENDERGAST GC. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunol Rev*. 2008; 222: 206-21.

KIM S; MOON A. Capsaicin-induced apoptosis of H-ras-transformed human breast epithelial cells is Rac-dependent via ROS generation. *Arch Pharmacol Res*. 2004; 27: 845-9.

KIM S, KIM JC, SUL D, et al. Nanoparticle formulation for controlled release of capsaicin. *J Nanosci Nanotechnol*. 2011; 11: 4586-91.

KLIBANOV AL, MARUYAMA K, BECKERLEG AM, et al. Activity of amphipathic PEG 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavourable for immunoliposome binding to target. *Biochim Biophys Acta*. 1991; 1062: 142-8.

KOBAYASHI H, BRECHBIEL MW. Nano-sized MRI contrast agents with dendrimer cores. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005; 57: 2271-86

KOBAYASHI H, WATANABE R, CHOYKE PL. Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; What Is the Appropriate Target? *Theranostics*. 2014; 4: 81-9.

KOEHN FE; CARTER GT. The evolving role of natural products in drug discovery *Nat Rev Drug Discov*. 2005; 4: 206-20.

KOHLER G; MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495–7.

KOZLOWSKI LP. Isoelectric Point Calculator. 2007-2013. [isoelectric.ovh.org](http://isoelectric.ovh.org), acessado em 21 de novembro de 2015.

KRATZ F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release*. 2008; 132: 171–83.

KRISHNAN E; SOKOLOVE J. Uric Acid in heart disease: a new C-reactive protein? *Curr Opin Rheumatol*. 2001; 23: 174-7.

KUNZ M, TOKSOY A, GOEBELER M. Strong expression of the lymphoattractant C-X-C chemokine Mig is associated with heavy infiltration of T cells in human malignant melanoma. *J Pathol*. 1999; 189: 552–8.

LADNER U, STELZER EHK, et al. Albumin-Based drug delivery as novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2003; 170: 4793-801.

LANGER K, BALTHASAR S, VOGEL V, et al. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Int J Pharm*. 2003; 257: 169-80.

LEE C, RAFFAGHELLO L, BRANDHORST S, et al. Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy. *Sci Transl Med*. 2012; 4: 124ra27.

LEE SY, FERRARI M, DECUZZI P. Shaping nano-/micro-particles for enhanced vascular interaction in laminar flows. *Nanotechnol*. 2009; 20: 11.

LEE YS, KANG YS, LEE JS, et al. Involvement of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the apoptotic cell death by capsaicin in HepG2 human hepatoma cells. *Free Radic Res*. 2004; 38: 405-12.

LEE BM, PARK KK. Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents. *Mutat Res*. 2003; 523-524: 265-78.

LEVINE JM, KELVIN JF, QUINN GP, et al. Infertility in reproductive-age female cancer survivors. *Cancer*. 2015; 121: 1532-9



- LI Z, WANG Y, SHEN J, et al. The measurement system of nanoparticle size distribution from dynamic light scattering data. *Optics Lasers Engineer*. 2014; 56: 94–8.
- LIN Y, CHOKSI S, SHEN HM, et al. Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. *J Biol Chem*. 2004; 279: 10822–8.
- LIN PC, LIN S, WANG PC, et al. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnol Adv*. 2014; 32: 711–26.
- LIU J. Refining the grip on nature's fine grains. Complementary tools, approaches enhance tried-and-true sand control methods. 2012. <http://www.drillingcontractor.org/refining-the-grip-on-natures-fine-grains-15705>. Acessado em 14 de agosto de 2015.
- LIU F, MU J, XING B. Recent advances on the development of pharmacotherapeutic agents on the basis of human serum albumin. *Curr Pharm Des*. 2015; 21: 1866–88.
- LOEFFLER M.; KROEMER G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res*. 2000; 256: 19–26.
- LÓPEZ-CARRILLO L, AVILA MH, DUBROW R. Chili pepper consumption and gastric cancer in Mexico: a case-control study. *Am J Epidemiol*. 1994; 139: 263–71.
- MACARRON R, BANKS MN, BOJANIC D, et al. Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nat Rev Drug Discov*. 2011; 10: 188–95.
- MAHMOUD ME, NIKAMI H, SHIINA T, et al. Capsaicin inhibits IFN-gamma-induced MHC class II expression by suppressing transcription of class II transactivator gene in murine peritoneal macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2010; 10: 86–90.
- MALAGARIE-CAZENAVE S, OLEA-HERRERO N, VARA D, et al. Capsaicin, a component of red peppers, induces expression of androgen receptor via PI3K and MAPK pathways in prostate LNCaP cells. *FEBS Lett*. 2009; 583: 141–7.
- MANOURY-SCHWARTZ B, CHIOCCHIA G, BESSIS N, et al. High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. *J Immunol*. 1997; 158: 5501–6.
- MARSHALL IC, OWEN DE, CRIPPS TV, et al. Activation of vanilloid receptor 1 by resiniferatoxin mobilizes calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores. *Br J Pharmacol*. 2003; 138: 172–6.
- MATERSKA M; PERUCKA I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L). *J Agric Food Chem*. 2005; 53: 1750–6.
- MCCABE MS, STABLEIN D, HAWKINS MJ. The modified Group C experience - Phase III randomized trials of IL-2 vs. IL-2+LAK in advanced renal cell carcinoma and advanced melanoma. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 1991; 10: A714.
- MCCARTHY GM, MCCARTY DJ. Effect of topical capsaicin in the therapy of painful osteoarthritis of the hands. *J Rheumatol*. 1992; 19: 604–7.

MELLOR AL, MUNN DH. Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8:74–80.

MICHALAKI V, SYRIGOS K, CHARLES P, et al. Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinic pathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer*. 2004; 90: 2312–6.

MILLER CH, MAHER SG, YOUNG HA. Clinical Use of Interferon-gamma. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1182: 69–79.

MIN JK, HAN KY, KIM EC, et al. Capsaicin inhibits *in vitro* and *in vivo* angiogenesis. *Cancer Res*. 2004; 64: 644–51.

MITELMAN AK, BUCCHERI VI, PRACCHIA LFI et al. Quantificação das citocinas séricas Th1/Th2 por citometria de fluxo no linfoma de Hodgkin clássico. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 2009; 31: 260-6.

MOGHIMI SM, HUNTER AC, MURRAY JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev*. 2001; 53: 283-318.

MONSEREENUSORN Y. Subchronic toxicity studies of capsaicin and capsicum in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1983; 41: 95-110.

MONTEITH G R, MCANDREW D, FADDY H M, et al. Calcium and Cancer: Targeting Ca<sup>2+</sup> Transport. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7: 519–30.

MORENILLA-PALAO C, PLANELLS-CASES R, GARCIA-SANZ N, et al. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J Biol Chem*. 2004; 279: 25665–72.

MORIKAWA S, BALUK P, KAIDOH T, et al. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol*. 2002; 160: 985-1000.

MÓZSIK G. Capsaicin as new orally applicable gastroprotective and therapeutic drug alone or in combination with nonsteroidal anti-inflammatory drugs in healthy human subjects and in patients. *Prog Drug Res*. 2014;68:209-58

MUKAI S, KJAERGAARD J, SHU S, et al. Infiltration of tumors by systemically transferred tumor reactive T lymphocytes is required for antitumor efficacy. *Cancer Res*. 1999; 59: 5245–9.

MURALIDHARA; NARASIMHAMURTHY K. Non-mutagenicity of capsaicin in albino mice. *Food Chem. Toxicol*. 1988; 26: 955-8.

MUTAKIN M, ANGELINA T, et al. Capsaicin level of various capsicum fruits. *Int J Pharm Pharmac Sci*. 2013; 5: 248-51.

MIYAKE N, MIURA T, SATO T, et al. J. Effect of *Zeta* potentials on bovine serum albumin adsorption on crown composite resin surfaces *in vitro*. *Biomed Sci Engineer*. 2013; 6: 273-6.

NAGABHUSHAN M, BHIDE SV. Mutagenicity of chili extract and capsaicin in short-term tests. *Environ Mutagen*. 1985; 7: 881–8.

NAGAI S, TOI M. Interleukin-4 and breast cancer. *Breast Cancer*. 2000; 7: 181-6.

NAGY I, SÁNTHA P, JANCÓS G, et al. The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. *Eur J Pharmacol*. 2004; 500: 351-69.

NAGY A, CHANG SH, DVORAK AM et al. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *Br J Cancer*. 2009; 100: 865–9.

NEDWIN GE, SVEDERSKY LP, BRINGMAN TS, et al. Effect of interleukin 2, interferon-gamma and mitogens on the production of tumor necrosis factors alpha and beta. *J Immunol*. 1985; 135: 2492-7.

NETTI PA, BAXTER LT, BOUCHER Y, et al. Time-dependent behaviour of interstitial fluid pressure in solid tumors: implications for drug delivery. *Cancer Res*. 1995; 55: 5451-8.

NEVES ALP. Preparação e caracterização de nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco com potencial atividade cicatrizante e antimicrobiana. Tese, 2013. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*. 2012; 75: 311-35.

NEUFELD G, KESSLER O. Pro-angiogenic cytokines and their role in tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006; 25: 373-85.

NG CM; REUTER WM. Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in chili peppers using the PerkinElmer Altus. CLAE dystem with PDA Detection. Application note PerkinElmer, Inc. USA. 2015.

NIKNEJAD H; MAHMOUDZADEH R. Comparison of different crosslinking methods for preparation of docetaxel-loaded albumin nanoparticles. *J Pharm Res*. 2015; 14: 385–94.

NIKOLICH-ŽUGICH J, GOLDMAN DP, COHEN PR, et al. Preparing for an aging world: engaging biogerontologists, geriatricians, and the society. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2016; 71: 435-44.

NOPANITAYA W; NYE SW. Duodenal mucosal response to the pungent principle of hot pepper (capsaicin) in the rat: Light and electron microscopic study. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1974; 30: 149-161.

NORDE W; LYKLEMA J. The adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at negatively charged polystyrene surfaces i. adsorption isotherms. Effects of Charge, Ionic Strength, and Temperature. *J Colloid Interface Sci*. 1978; 66: 257-65.

NOTANI PN, JAYANT K. Role of diet in upper aerodigestive tract cancers. *Nutr Cancer*. 1987; 10: 103-13.

NUMAZAKI M, TOMINAGA T, TAKEUCHI K, et al. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 8002–6.

NUMEROF RP, ARONSON FR, MIER JW. IL-2 stimulates the production of IL-1 alpha and IL-1 beta by human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol.* 1988; 141: 4250-7.

OETTL K; STAUBER RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol.* 2007; 151: 580-90

OKADA Y; OKAJIMA H. Antioxidant effect of capsaicin on lipid peroxidation in homogeneous solution, micelle dispersions and liposomal membranes. *Redox Rep.* 2001; 6: 117-22.

OLAJOS EJ; SALEM H. Riot control agents: pharmacology, toxicology, biochemistry and chemistry. *J Appl Toxicol.* 2001; 21: 355-91.

OLIVER KG, KETTMAN JR, FULTON RJ. Multiplexed analysis of human cytokines by use of the Flow Metrix system. *Clin Chem.* 1998; 44: 2057-60.

ONU, Department of Economic and Social Affairs. Revision of World Population Prospects. United Nations New York, 2015.

OORTGIESEN M, VERONESI B, EICHENBAUM G, et al. Residual oil fly ash and charged polymers activate epithelial cells and nociceptive sensory neurons. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 278: L683-L95.

ORLANDINE LF. Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos wistar expostos à amônia por inalação. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

OTHMAN ZA, AHMED YBH, HABILA M, et al. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in capsicum fruit samples using high performance liquid chromatography. *Molecules.* 2011; 16: 8919-29.

PAPAKOSTA M, DALLE C, HAYTHORNTHTWAITE A, et al. The chimeric approach reveals that differences in the TRPV1 pore domain determine species-specific sensitivity to block of heat activation. *J Biol Chem.* 2011; 286: 39663-72.

PAPETTI M, HERMAN IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 282: C947-70.

PARK JY, KAWADA T, HAN IS, et al. Capsaicin inhibits the production of tumor necrosis factor alpha by LPS-stimulated murine macrophages, RAW 264.7: a PPARgamma ligand-like action as a novel mechanism. *FEBS Lett.* 2004; 572: 266-70.

PARK KK, SURH YJ. Effects of capsaicin on chemically-induced twostage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett.* 1997; 114: 183-4.

PARK JW. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Res.* 2002; 4: 95-9.

PARKASH J, ASOTRA K. Calcium Wave Signaling in Cancer cells. *Life Sci.* 2010; 87: 587-95.

- PENG W, JIANG X, ZHU Y, et al. Oral delivery of capsaicin using MPEG-PCL nanoparticles. *Acta Pharmacol Sin*. 2015; 36: 139-48
- PEREIRA J. *Capsicum annum*. In: Carson J, editor. *The elements of materia medica and therapeutics*. 3rd ed. Philadelphia: Blanchard and Lea. 1854, p. 505–7.
- PERRY L, DICKAU R, ZARRILLO S, et al. Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L). *Science*. 2007; 315: 986-8.
- PHELPS CB, WANG RR, CHOO SS, et al. Differential regulation of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 sensitivity through a conserved binding site on the ankyrin repeat domain. *J Biol Chem*. 2010. 285: 731–40
- PINAKI RD, SRUJAN M, APURVA RP, et al. Topical delivery of anti-TNF $\alpha$  siRNA and capsaicin via novel lipid-polymer hybrid nanoparticles efficiently inhibits skin inflammation in vivo. *J Control Release*. 2013; 170: 51–63.
- PLATANIAS LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5: 375–86.
- PLATANIAS LC, UDDIN S, BRUNO E, et al. CrkL and CrkII participate in the generation of the growth inhibitory effects of interferons on primary hematopoietic progenitors. *Exp Hematol*. 1999; 27:1315–21.
- PORSZASZ J; JANCZO N. Studies on the action potentials of sensory nerves in animals desensitized with capsaicine. *Acta Physiol Acad Sci Hung*. 1959; 16: 299–306.
- PRENDERGAST GC. Immune escape as a fundamental trait of cancer: focus on IDO. *Oncogene*. 2008; 27: 3889–900.
- PREVARSKAYA N, SKRYMA R, SHUBA Y. Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11: 609-18.
- PRIOR M, GREEN F, LOPEZ A, et al. Capsaicin pretreatment modifies hydrogen sulphide-induced pulmonary injury in rats. *Toxicol Pathol*. 1990; 18: 279-88.
- PROKOPCHUK O, LIU Y, HENNE-BRUNS D, et al. Interleukin-4 enhances proliferation of human pancreatic cancer cells: evidence for autocrine and paracrine actions. *Br J Cancer*. 2005; 92: 921-8.
- QIAN K, WU J, ZHANG E, et al. Biodegradable double nanocapsule as a novel multifunctional carrier for drug delivery and cell imaging. *Int J Nanomed*. 2015; 10: 4149—57.
- RALPH SJ, RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ S, NEUZIL J, et al. The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy. *Mol Aspects Med*. 2010; 31: 145-70
- RAPSOMANIKI E, TIMMIS A, GEORGE J, et al. Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specific associations in 1•25 million people. *Lancet*. 2014; 383: 1899–1911.

RATNER BD, HOFFMAN AS, SCHOEN FJ, et al. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. Academic Press; 2004.

RAZA K, SHAREEF MA, SINGAL P, et al. Lipid-based capsaicin-loaded nano-colloidal biocompatible topical carriers with enhanced analgesic potential and decreased dermal irritation. *J Liposome Res.* 2014; 24: 290-6.

RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26: 1231-7.

REBER AJ, CHIRKOVA T, KIM JH, et al. Immunosenescence and challenges of vaccination against influenza in the aging population. *Aging Dis.* 2012; 3: 68–90.

REDDY AC, LOKESH BR. Studies on anti-inflammatory activity of spice principles and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on carrageenan-induced inflammation in rats. *Ann Nutr Metab.* 1994; 38: 349-58.

REILLY CA; YOST GS. Metabolism of capsaicinoids by P450 enzymes: a review of recent findings on reaction mechanisms, bio-activation, and detoxification processes. *Drug Metab Rev.* 2006; 38: 685-706.

REILLY CA, TAYLOR JL, LANZA DL, et al. Capsaicinoids cause inflammation and epithelial cell death through activation of vanilloid receptors. *Toxicol Sci.* 2003; 73: 170–81.

REILLY A, JOHANSEN ME, LANZA DL, et al. Calcium-Dependent and Independent Mechanisms of Capsaicin Receptor (TRPV1)-Mediated Cytokine Production and Cell Death in Human Bronchial Epithelial Cells Christopher. *J Biochem Mol Toxicol.* 2005; 19: 266–75.

ROCHE M, RONDEAU P, SINGH NR, et al. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 2008; 582: 1783-7

RODERICK HL, COOK SJ. Ca<sup>2+</sup> Signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca<sup>2+</sup> for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8: 361-75.

ROMERO EL, MORILLA MJ, REGTS J, et al. On the mechanism of hepatic transendothelial passage of large liposomes. *FEBS Lett.* 1999; 448: 193–6.

ROSA A, DEIANA M, CASU V, et al. Antioxidant activity of capsinoids. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 7396-401.

ROSENBERG SA, YANG JC, TOPALIAN SL, et al. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high dose bolus IL-2. *JAMA.* 1994; 271: 907-13.

ROSENBERG SA, LOTZE MT, YANG JC, et al. Experience with the use of high dose IL-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann Surg.* 1989; 210: 474-85.

ROZGA J, PIĄTEK T, MAŁKOWSKI P. Human albumin: old, new, and emerging applications. *Ann Transplant.* 2013; 18: 205-17.

RUEGG C, YILMAZ A, BIELER G, et al. Evidence for the involvement of endothelial cell integrin  $\alpha V\beta 3$  in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN- $\gamma$ . *Nat Med*. 1998; 4: 408–14.

SAADE NE, MASSAAD CA, OCHOA-CHAAR CI, et al. Upregulation of proinflammatory cytokines and nerve growth factor by intraplantar injection of capsaicin in rats. *J Physiol*. 2002; 545: 241–53.

SAITO, A.; YAMAMOTO, M. Acute oral toxicity of capsaicin in mice and rats. *J Toxicol Sci*. 1996; 21: 195-200.

SÁNCHEZ AM, SÁNCHEZ MG, MALAGARIE-CAZENAVE S, et al. Induction of apoptosis in prostate tumor PC-3 cells and inhibition of xenograft prostate tumor growth by the vanilloid capsaicin. *Apoptosis*. 2006; 11: 89-99.

SANCHEZ MG, SANCHEZ AM, COLLADO B, et al. Expression of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in LNCaP and PC-3 prostate cancer cells and in human prostate tissue. *Eur J Pharmacol*. 2005, 515: 20-7.

SANCHO R, LUCENA C, MACHO A, et al. Immunosuppressive activity of capsaicinoids: capsiate derived from sweet peppers inhibits NF-kappa B activation and is a potent antiinflammatory compound *in vivo*. *Eur J Immunol*. 2002; 32: 1753–63.

SCHAFFAZICK SR, GUTERRES SS, FREITAS LL, et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quím. Nova*. 2003; 26: 726-37.

SCHINDLER H, LUTZ MB, ROLLINGHOFF M, et al. The production of IFN- $\gamma$  by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J Immunol*. 2001; 166: 3075–82.

SCHNEIDER L, HACKERT T, HECK M, et al. Capsaicin reduces tissue damage in experimental acute pancreatitis. *Pancreas*. 2009; 38: 676-80.

SCHRODER K, HERTZOG PJ, RAVASI T, et al. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004; 75:163–89.

SCHWAB BL, GUERINI D, DIDSZUN C, et al. Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis, *Cell Death Differ*. 2002; 9: 818–31.

SCOTT AM, WOLCHOK JD, OLD LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12: 278-87.

SEBAK S, MIRZAEI M, MALHOTRA M, et al. Human serum albumin nanoparticles as an efficient noscapine drug delivery system for potential use in breast cancer: preparation and *in vitro* analysis. *Int J Nanomed*. 2010; 5: 525–32

SEGAERT S, VAN CUTSEM E. Clinical signs, pathophysiology and management of skin toxicity during therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors. *Ann Oncol*. 2005; 16: 1425-33.

SELIGER B, RUIZ-CABELLO F, GARRIDO F. IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. *Adv Cancer Res.* 2008; 101: 249–76

SERRA I, YAMAMOTO M, CALVO A, et al. Association of chili pepper consumption, low socioeconomic status and longstanding gallstones with gallbladder cancer in a Chilean population. *Int J Cancer.* 2002; 102: 407-11.

SHI Q, ZHOU Y, SUN Y. Influence of pH and ionic strength on the steric mass-action model parameters around the isoelectric point of protein. *Biotechnol. Progress.* 2005; 21: 516–23.

SHIMANOVICH U, BERNARDES GJL, KNOWLESA TPJ, et al. Protein micro- and nano-capsules for biomedical applications. *Chem Soc Rev.* 2014; 43: 1361-71.

SHIMEDA Y, HIROTANI Y, AKIMOTO Y, et al. Protective effects of capsaicin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28: 1635-8.

SHIN CY, SHIN J, KIM BM, et al. Essential role of mitochondrial permeability transition in vanilloid receptor 1-dependent cell death of sensory neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2003; 24: 57–68.

SHIROIWA T, FUKUDA T, TSUTANI K. Cost-effectiveness analysis of bevacizumab combined with chemotherapy for the treatment of metastatic colorectal cancer in Japan. *Clin Ther.* 2007; 29: 2256-67.

SHIROIWA T, FUKUDA T, TSUTANI K. Out-of-pocket payment and cost-effectiveness of XELOX and XELOX plus bevacizumab therapy: from the perspective of metastatic colorectal cancer patients in Japan. *Int J Clin Oncol.* 2010; 15: 256-62.

SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin.* 2015; 65: 5–29.

SMITH BD, SMITH GL, HURRIA A, et al. Future of cancer incidence in the United States: burdens upon an aging, changing nation. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 2758–2765.

SMITH CG; STOPFORD W. Health hazards of pepper spray. *N C Med J.* 1999; 60: 268-74.

SONG X, LONG SR, BARBER B, et al. Systematic review on infusion reactions associated with chemotherapies and monoclonal antibodies for metastatic colorectal cancer. *Curr Clin Pharmacol.* 2012; 7: 56-65.

SRINIVASAN K. Biological activities of red pepper (*capsicum annuum*) and its pungent principle capsaicin: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015; 12: 0.

SRINIVASAN K, SAMBAIAH K, CHANDRASEKHARA N. Spices as beneficial hypolipidemic food adjuncts: a review. *Food Rev Int.* 2004; 20: 187-220.

STALL A, SUN Q, VARRO R, et al. A single tube flow cytometric multi bead assay for isotyping mouse monoclonal antibodies. Abstract LB77. *Experimental Biology Meeting* 1998.

STÄNDER S, MOORMANN C, SCHUMACHER M, et al. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol.* 2004; 13: 129–139.



STEFFEE CH, LANTZ PE, FLANNAGAN LM, et al. Oleoresin capsicum (pepper) spray and “in-custody deaths. *Am J Forensic Med Pathol*. 1995; 16: 185–92.

STEWART TA, YAPA KT, MONTEITH GR. Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 14: 298-303.

STONE JB, DEANGELIS LM. Cancer-treatment-induced neurotoxicity-focus on newer treatments. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016; 13: 92-105.

SURESH D, SRINIVASAN K. Tissue distribution; elimination of capsaicin, piperine; curcumin following oral intake in rats. *Indian J Med Res*. 2010; 131: 682-91.

SURH YJ; LEE SS. Capsaicin, a double-edged sword: toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. *Life Sci*. 1995; 56: 1845-55.

SZOLCSÁNYI J, SÁNDOR Z. Multimeric TRPV1 nociceptor: a target for analgesics. *Trends Pharmacol Sci*. 2012; 33: 646-55.

TACHAPRUTINUNA A, PAN-INC P, WANICHWECHARUNGRUANG S. Mucosa-plate for direct evaluation of mucoadhesion of drug carriers. *Int J Pharmac*. 2013; 441: 801–808)

TAHERI A, ATYABI F, NOURI FS, et al. Nanoparticles of conjugated methotrexate-human serum albumin: preparation and cytotoxicity evaluations. *J Nanomat*. 2011; 7.

TAKAHATA K, CHEN X, MONOBE K, et al. Growth inhibition of capsaicin on hela cells is not mediated by intracellular calcium mobilization. *Life Sciences*. 1999; 64: 165–71.

TAKANO F, YAMAGUCHI M, TAKADA S, et al. Capsicum ethanol extracts and capsaicin enhance interleukin-2 and interferon-gamma production in cultured murine Peyer's patch cells ex vivo. *Life Sci*. 2007; 80: 1553-63.

TAKASHIBA S, SHAPIRA L, AMAR S, et al. Cloning and characterization of human TNF alpha promoter region. *Gene*. 1993; 131: 307-8.

TARTAGLIA LA, AYRES TM, WONG GH et al. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*. 1993; 74: 845–53.

TAVERNA M, MARIE AL, MIRA JP, et al. Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Ann Intensive Care*. 2013; 3: 4.

THIBODEAU J, BOURGEOIS-DAIGNEAULT MC, LAPOINTE R. Targeting the MHC Class II antigen presentation pathway in cancer immunotherapy. *Oncoimmunol*. 2012; 1: 908–16.

THIND A, DIAMANT A, HOQ L, et al. Method of detection of breast cancer in low-income women. *J Womens Health (Larchmt)*. 2009; 18: 1807–1811.

THOMPSON K; DALE W. Guiding principles for the care of older adults with multimorbidity: An approach for clinicians. *J Am Geriatr Soc*. 2012; 60: E1–E25.

THOMPSON K; DALE W. How do I best manage the care of older patients with cancer with multimorbidity? *J Geriatr Oncol*. 2015; 6: 249-53.

- THRESH JC. Isolation of capsaicin. *Pharmaceut. J Transactions*. 1876; 6: 941–7.
- TOLEDO JB, ARNOLD SE, RAIBLE K, et al. Contribution of cerebrovascular disease in autopsy confirmed neurodegenerative disease cases in the National Alzheimer's Coordinating Centre. *Brain*. 2013; 136: 2697–706.
- TOTH B, GANNETT P. Carcinogenicity of lifelong administration of capsaicin of hot pepper in mice. *In vivo*. 1992; 6: 59-63.
- TSUJISAKI M, IGARASHI M, SAKAGUCHI K, et al. Immunochemical and functional analysis of HLA class II antigens induced by recombinant immune interferon on normal epidermal melanocytes. *J Immunol*. 1987; 138: 1310–6.
- TUOYA, BABA N, SHIMOISHI Y, et al. Apoptosis induction by dohevanil, a DHA substitutive analog of capsaicin, in MCF-7 cells. *Life Sci*. 2006; 78: 1515-9.
- VAJPAYEE N, GRAHAM SS, BEM S. Basic examination of blood and bone marrow. MCPHERSON RA, PINCUS MR, eds. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 22º edição. Filadelfia, Editora Elsevier Saunders; 2011:cap 30.
- VALKO M, RHODES CJ, MONCOL J. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006; 160: 1-40
- VAN-DOOREN AA, MULLER BW. Purity determinations of drugs with differential scanning calorimetry (DSC): critical review. *Int J Pharm*. 1984; 20: 217-233.
- VAN HORSSSEN R, TEN HAGEN TL, EGGERMONT AM. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist*. 2006; 11: 397-408.
- VASSILAKOPOULOU M, BOOSTANDOOST E, PAPAXOINIS G, et al. Anticancer treatment and fertility: Effect of therapeutic modalities on reproductive system and functions. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016; 97: 328-34.
- VASSILAKOPOULOU M, BOOSTANDOOST E, PAPAXOINIS G, et al. Anticancer treatment and fertility: Effect of therapeutic modalities on reproductive system and functions. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015; 121: 1532-9.
- VERGARA DN, LOZADA-REQUENA I, AGUILAR JO. Efecto de la capsaicina sobre la producción de TNF- $\alpha$  en células mononucleares. Estudio piloto. *Rev Perú Med Exp Salud Publica*. 2006; 23: 1-4.
- VERONESI B, OORTGIESEN M, CARTER JD, et al. Particulate matter initiates inflammatory cytokine release by activation of capsaicin and acid receptors in a human bronchial epithelial cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 154: 106–15.
- VERONESI B, WEI G, ZENG JQ, et al. Electrostatic charge activates inflammatory vanilloid (VR1) receptors. *Neurotoxicol* 2003; 24: 463–73.
- VIEIRA S, HOFFMANN R. *Estatística experimental*. São Paulo: Atlas, 1989. 175p.
- VOGELZANG NJ; RATAIN MJ. Cancer chemotherapy and skin changes. *Ann Intern Med*. 1985; 103: 303-30.

WAITEA CL; ROTH CM Nanoscale Drug Delivery Systems for Enhanced Drug Penetration into Solid Tumors: Current Progress and Opportunities. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012; 40: 21–41.

WAITE MS, AUBIN AJ. A modular HP LC system for routine analysis of capsaic in from hot sauces. Waters Corporation, Milford, MA, U.S.

WAJANT H, PFIZENMAIER K, SCHEURICH P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003; 10: 45–65.

WAJANT H. Death receptors. *Essays Biochem.* 2003; 39: 53–71

WANG ZL. Characterization of Nanophase Materials. *Transmission Electron Microscopy and Spectroscopy of Nanoparticles.* 2001; Cap. 3: 37–80. Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH.

WANG X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 2001; 15: 2922–33.

WANG X; LIN Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol Sin.* 2008; 29: 1275–88.

WANG A, LU SD, MARK DF. Site-specific mutagenesis of the human interleukin-2 gene: structure-function analysis of the cysteine residues. *Science.* 1984; 224: 1431–3.

WHO, Global Health Observatory Data Repository, Life expectancy - Data by World Bank income group, 2015. <http://apps.who.int/gho/data/node.main.688>, acessado em 03 de fevereiro de 2016.

WILLIAMS DB; CARTER CB. The transmission electron microscope. *Transmission electron microscopy.* Ed. Springer. 2009.

WISEMAN H, HALLIWELL B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 1996; 313: 17–29.

WU CC, LIN JP, YANG JS, et al. Capsaicin induced cell cycle arrest and apoptosis in human esophagus epidermoid carcinoma CE 81T/VGH cells through the elevation of intracellular reactive oxygen species and Ca21 productions and caspase-3 activation. *Mutat Res.* 2006; 601: 71–82.

WU TTL, PETERS AA, TAN PT, et al. Consequences of Activating the Calcium-permeable Ion Channel TRPV1 in Breast Cancer Cells with Regulated TRPV1 Expression. *Cell Calcium.* 2014; 56: 59–67.

WU L, ZHANG J, WATANABE W. Nanodrug particles and nanoformulations for drug delivery. *Physic Chem Stability Drug Nanopart.* 2011; 63: 456–69.

WUNDER A, MULLER-LADNER U, STELZER EH, et al. Albumin-based drug delivery as novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis, *J Immunol Methods.* 2003; 170: 4793–801.

YANG KM, PYO JO, KIM GY, et al. Capsaicin induces apoptosis by generating reactive oxygen species and disrupting mitochondrial transmembrane potential in human colon cancer cell lines. *Cell Mol Biol Lett.* 2009; 14: 497–510.

YANG Y, KARAKHANOVA S, HARTWIG W, et al. Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. *J Cell Physiol*. 2016

YANG W, GONG X, ZHAO X, et al. Capsaicin Induces Apoptosis in HeLa Cells via Bax/Bcl-2 and Caspase-3 Pathways. *Asian J Trad Med*. 2006; 1: 159-65.

YOUNG HA, HARDY KJ. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol*. 1995; 58: 373–81.

YU Z, YU M, ZHANG Z, et al. Bovine serum albumin nanoparticles as controlled release carrier for local drug delivery to the inner ear *Nanoscale Res Let*. 2014, 9: 343-50.

YUAN F, DELLIAN M, FUKUMURA D, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res*. 1995; 55: 3752-6.

ZHANG et al. The comparison of the normal blood values of rat wistar with different age and sex. *Asian J Drug Metab Pharmacok*. 2004; 4: 215-8.

ZHANG R, HUMPHREYS I, SAHU RP, et al. *In vitro* and *in vivo* induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway. *Apoptosis*. 2008; 13: 1465–78.

ZHANG J, NAGASAKI M, TANAKA Y, et al. Capsaicin inhibits growth of adult T-cell leukemia cells. *Leuk Res*. 2003; 27: 275-83.

ZI P, YANG X, KUANG H, et al. Effect of HP $\beta$ CD on solubility and transdermal delivery of capsaicin through rat skin. *Int J Pharm*. 2008; 358: 151–8






ZIMMER AR, LEONARDI B, ZIMMER ER. Long-Term Oral Administration of Capsicum baccatum Extracts Does Not Alter Behavioral, Hematological, and Metabolic Parameters in CF1 Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012, Article ID 196358, 9.

ZIYAD S, IRUELA-ARISPE ML. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis. *Genes Cancer*. 2011; 2: 1085-96.

ZHU Y, WANG M, ZHANG J, et al. Improved oral bioavailability of capsaicin via liposomal nanoformulation: preparation, in vitro drug release and pharmacokinetics in rats. *Arch Pharm Res*. 2015; 38: 512-21.

## 7 ANEXO I: PUBLICACOES E DIVULGAÇÕES DO TRABALHO

### Patente:

28/03/2016 860160068441 15:08 NPWB	 0000221602266780	 BR 10 2016 006758 8	
Protocolo	Número	Código QR	
 <b>INPI</b> INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL		INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Diretoria de Patentes Sistema e-Patentes/Depósito	
<b>DIRPA</b> 	Tipo de Documento: Recibo de Peticionamento Eletrônico		DIRPA
Título do Documento: <b>Recibo</b> DIRPA-FQ001 - Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição		Código: <b>RECIBO</b>	Página: 1 / 2
		Versão: 01	
		Modo: Produção	

**O Instituto Nacional da Propriedade Industrial informa:**  
Este é um documento acusando o recebimento de sua petição conforme especificado abaixo:

<b>Dados do INPI:</b>	
Número de processo:	BR 10 2016 006758 8
Número da GRU principal:	00.000.2.2.16.0226678.0 (serviço 200)
Número do protocolo:	860160068441
Data do protocolo:	28 de Março de 2016, 15:08 (BRT)
Número de referência do envio:	174609
<b>Dados do requerente ou interessado:</b>	
Tipo de formulário enviado:	DIRPA-FQ001 v.006
Referência interna:	Nanopartículas Capsa
Primeiro requerente ou interessado:	Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO-PR
CNPJ do primeiro requerente ou interessado:	77.902.914/0001-72
Número de requerentes ou interessados:	1
Título do pedido:	OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE CAPSAICINA REVESTIDAS COM O POLÍMERO NATURAL ALBUMINA PREFERENCIALMENTE PELO MÉTODO DE COACERVAÇÃO

### Publicação:

#### Cancer Research Journal

2014; 2(6-1): 34-41

Published online December 26, 2014 (<http://www.sciencepublishinggroup.com/j/crj>)

doi: 10.11648/j.crj.s.2014020601.14

ISSN: 2330-8192 (Print); ISSN: 2330-8214 (Online)



## Can capsaicin present in food act as carcinogenic, antitumor or both

Guilherme Barroso Langoni de Freitas<sup>1,2,\*</sup>, Najeh Maissar Khalil<sup>2</sup>, Iara José de Messias-Reason<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Post-Degree Program in Internal Medicine and Health Sciences at UFPR, Department of Clinical Patology, Federal University of Parana, Curitiba, Parana, Brazil

<sup>2</sup>Department of Pharmacy, State University of Center-West, Guarapuava, Parana, Brazil

Observação: Outros 3 artigos sobre o estudo foram submetidos à publicação e estão aguardando resposta.